

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

**Affinitätschromatographie mit orientiert und nicht orientiert immobilisiertem
Calmodulin am Beispiel der Aufreinigung der Ubiquitin-Calmodulin-Synthetase
Faktor 2**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Cyrus Khandanpour
aus Teheran/ Iran
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. H.P. Jennissen

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.Chem. A.W. Rettenmeier

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
2. Materialien und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.2 Präparative Methoden	14
2.2.1 Herstellung von Roh-uCaM-Synthetase in vivo	14
2.2.1.1 Induktion einer Retikulozytose	14
2.2.1.2 Lysatpräparation aus Retikulozyten	14
2.2.2 Aufreinigung von Calmodulin aus Rinderhoden	15
2.2.3 Herstellung vom kalten BH-Calmodulin	15
2.2.4 Radioaktive Markierung von Calmodulin mit ^{125}I od nach der Methode von Bolton und Hunter (BH-Calmodulin)	15
2.2.5 Radioaktive Markierung von Ubiquitin mit ^{125}I od	16
2.2.6 Herstellung der Ubiquitin-Sepharose (Ubi-Seph)	16
2.2.7 Synthese von Glutathion-Sepharose	17
2.2.8 Molekularbiologische Synthese des Glutathion-S-Transferase-(GST-Calmodulin) aus E.coli	18
2.2.9 Herstellung von Glutathion-S-Transferase-Calmodulin-Sepharose (GST-Calmodulin-Sepharose)	18
2.2.10 Präparation von Calmodulin-Sepharose nach der Divinylsulfon-Aktivierungsmethode Methode (DVS-Calmodulin)	19
2.3 Chromatographische Methoden	19
2.3.1.1 Herstellung von APFII aus Retikulozytenlysat auf Fractogel EMD-DEAE 650 (S)	19
2.3.1.2 Affinitätschromatographie auf Ubiquitin-Sepharose 4B	20
2.3.1.3 Affinitätschromatographie auf DVS-Calmodulin-Sepharose	22
2.3.1.4 Anionenaustauschchromatographie auf MonoQ HR 5/5	20
2.3.1.5 Gelfiltration auf Superose 6 p.g.	21
2.3.2 Chromatographie auf orientiert immobilisiertem Calmodulin	23
2.3.2.1 Affinitätschromatographie auf Glutathion-S-Transferase-Calmodulin-Gel	23

2.4	Analytische Methoden	23
2.4.1	Automatisierte Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	23
2.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	24
2.4.3	Autoradiographie	25
2.4.4	Overlay mit ^{125}I -BH-Calmodulin	25
2.4.5	Bestimmung der uCaM-Synthetase-Aktivität	26
2.4.6	Leitfähigkeitsmessung	28
2.4.7	Datenauswertung	28
2.4.8	Bioinformatische Auswertungen	28
3.	Ergebnisse	
3.1	Herstellung und Eigenschaften eines neuen Affinitätsgel für die Aufreinigung von Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase Faktor 2	31
3.1.1	Strukturelle Unterschiede zwischen gerichtet und ungerichtet immobilisiertem Calmodulin	31
3.1.2	Isolierung von Glutathion-S-Transferase-Calmodulin (GST- Calmodulin)	34
3.1.3	Bestimmung der Kapazität von Glutathion-Sepharose für Glutathion-S-Transferase-Calmodulin	35
3.1.4	Affinitätschromatographie von Ubiquityl-Calmodulin- Synthetase Faktor 2 auf GST-Calmodulin-Sepharose	39
3.1.5	Bindungsstabilität von GST-Calmodulin-Sepharose	41
3.1.6	Bestimmung der Bindungskapazität von GST-Calmodulin- Sepharose für uCaM Syn-F2	44
3.1.7	Vergleich der Affinitätschromatographie auf gerichtet und nicht gerichtet immobilisiertem Calmodulin	47
3.2	Anionenaustauschchromatographische (MonoQ) Untersuchungen zur Heterogenität von uCaM Syn-F2 nach Affinitätschromatographie auf GST- Calmodulin-Sepharose	47
3.2.1.	Einfluss der Lagerungszeit und Calcium auf die Fraktion U-SepH-D vor Affinitätschromatographie	47
3.3	Molekulare Massenbestimmung der MonoQ-Fraktion	

	mittels Gelfiltration auf Superose 6 p.g.	56
3.3.1	Heterogenität langzeitgelagerter Pools	56
3.3.2	Vergleich der Molekularmassen der anionenaustausch- chromatographisch gereinigter APFII-MonoQ Pool 3 und CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3, die mit zusätzlichen Protease- inhibitoren gelagert wurden	59
3.3.3	Zusammenfassung der Affinitäts-, MonoQ- und Gelfiltrations- schritte	61
3.4	Analyse der angereicherten Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools auf Calmodulin bindende Proteine mit Hilfe eines Overlays	63
3.5	Bioinformatische Analyse der Calmodulin-Kopplung in Hinblick auf den Vergleich orientierte und nicht orientierte Kopplung	69
3.5.1	Verwendung von Netto-Energiepotentiale zur Kopplungsvorhersage	69
3.5.2	Zugänglichkeit der Lysine des Calmodulins und der Ribonuclease	74
4.	Diskussion der Ergebnisse	77
4.1	Orientierte versus nicht orientierte Proteinadsorption	77
4.2	Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die biochemischen Eigenschaften der uCaM Synthetase Faktor 2	80
4.3	Nachweis der Calmodulin-bindenden Untereinheit durch Overlay	82
5.	Zusammenfassung	84
6.	Literaturverzeichnis	85
7.	Danksagung	98
8.	Lebenslauf	99

1. Einleitung

Proteine können bedingt durch ihre vielfältige Tertiär- und Quartärstruktur spezifisch mit den unterschiedlichsten Molekülen (DNA, andere Proteine, Kohlenhydrate etc) interagieren. Diese Eigenschaft kann durch Immobilisierung an verschiedenen Trägermaterialien für unterschiedliche Zwecke verwendet werden. Immobilisierte Eiweiße wurden unter anderem zur Affinitätschromatographie (Jennissen und Botzet 1993), zur Konstruktion von Biosensoren (Wang und Jin 2003), zur Aufdeckung der Funktionsweise verschiedener Proteine (Thomson et al. 1999) sowie im industriellen Rahmen zur Umwandlung von Kohlenhydraten in z.B. Glukose eingesetzt. Für die Affinitätschromatographie wurden Proteine zu Beginn zunächst ungerichtet, zufällig und in unterschiedliche sterische Ausrichtungen an Trägermaterialien immobilisiert. Einige dieser sterischen Ausrichtungen erschwerten jedoch die Bindung der Zielmoleküle an das Eiweiß. Zur Vermeidung solcher ungünstiger sterischer Ausrichtungen wurden die Eiweißmoleküle an Glykoproteine (z.B. Liu und Scouten 1996), Avidin (Wilchek und Bayer 1990) oder an komplexere Biomolekülen wie z.B. Lectine (Turkova et al. 1986) gebunden, um so eine gerichtete Immobilisierung zu erreichen.

Jedoch ist all diesen Arbeiten gemeinsam, dass eine vollkommen gleichartige, homogene Immobilisierung nicht erreicht wurde, so dass die Eiweiße weiterhin eine gewisse Zahl unterschiedlicher sterischer Ausrichtungen aufwiesen.

Im Rahmen dieser Dissertation soll durch Verwendung des Fusionsproteinsystems (Glutathion-S-Transferase-Systems) jedoch eine vollkommen gleichartige Immobilisierung der Proteine erreicht werden.

In einem weiteren Schritt sollen dann die affinitätschromatographischen Eigenschaften der so gebundenen Proteine am Beispiel der Aufreinigung des Ubiquityl-Calmodulin Synthetase Faktor 2 (uCaM Syn-F2) auf gerichtet immobilisiertem Calmodulin untersucht werden.

Zunächst wird das Protein beschrieben, welches affinitätschromatographisch aufgereinigt werden soll.

UCaM Syn-F2 ist eine Komponente der Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase (uCaM-Synthetase), welche wiederum die Ubiquitylierung des Calmodulins katalysiert.

Jennissen und Laub identifizierten 1988 (Jennissen und Laub 1988) die Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase (uCaM-Synthetase, EC 6.3.2.2.21) und grenzten die Aktivität von den anderen Ubiquitin-konjugierenden Enzymaktivitäten ab. Die Affinität dieses Enzymes

zu Calmodulin ist viel niedriger ($K_m = 8 \mu\text{M}$) als die anderer mit Calmodulin in Interaktion tretender Proteine wie zum Beispiel der Phosphorylase Kinase mit einer Affinität von $K_m = 23 \text{ nM}$ (Jennissen und Botzet 1993).

In Gegenwart von Calcium und unter ATP-Verbrauch wird der Teil des Calmodulins ((a-b) $\text{CaM}_{\text{freies}}$), der nicht von anderen calmodulinbindenden Proteinen (CBP) gebunden wurde, durch uCaM-Synthetase ubiquityliert (U_cCaM , Abb. 1). Durch die Ubiquitylierung wird die Funktion des Calmodulins als „second-messenger“ ausgeschaltet (Jennissen 1995). Prinzipiell ist die Ubiquitylierung ein reversibler Prozess, der durch die Isopeptidase (in Abwesenheit von Calcium) umgekehrt werden kann (Laub und Jennissen 1997).

Zusammenfassend ist dieser Sachverhalt in Abb. 1 dargestellt (angelehnt an Jennissen 1995).

Majetschak gelang es, durch Anwendung verschiedener chromatographischer Methoden, (Majetschak et al. 1998a, Majetschak et al. 1998b, Laub et al. 1998) uCaM-Synthetase anzureichern. Er wies nach, dass uCaM-Synthetase aus mehreren Komponenten besteht. Es gelang eine dieser Komponenten, die uCaM-Synthetase Faktor 1 (uCaM Syn-F1), zu isolieren, die molekulare Masse des so erhaltenen Homodimers mit 200 kDa anzugeben und schließlich die Aminosäuresequenz zu bestimmen (Majetschak et al. 1998a). Weitere Untersuchungen ergaben, dass uCaM Syn-F1 hinsichtlich seiner Funktion der Gruppe der Ubiquitin-aktivierenden-Enzyme zuzuordnen ist.

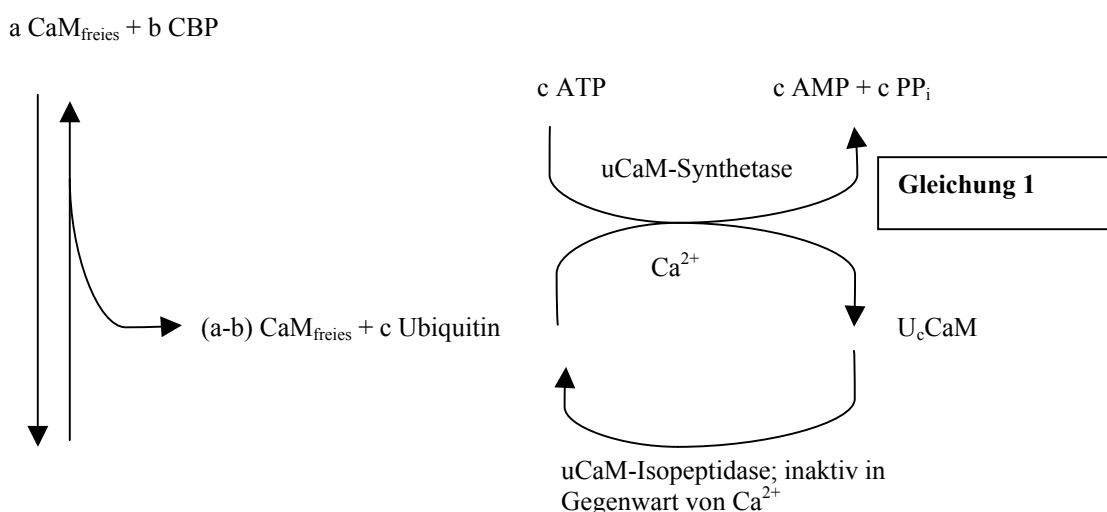


Abb. 1: Calmodulin, uCaM-Synthetase und Isopeptidase im Stoffwechselkreislauf

Freies Calmodulin ($\text{CaM}_{\text{freies}}$) tritt in Interaktion mit den verschiedensten calmodulinbindenden Proteinen (CBP, z.B. Phosphorylase Kinase). In Gegenwart von Calcium wird der Teil des Calmodulins ((a-b) $\text{CaM}_{\text{freies}}$), der nicht von anderen Proteinen gebunden wurde, durch uCaM-Synthetase ubiquityliert (U_cCaM). Die Calmodulin

bindenden Proteine haben häufig eine höhere Affinität ($K_m = 30-50 \text{ nM}$) zu Calmodulin als die uCaM-Synthetase ($K_m = 8 \text{ } \mu\text{M}$). Die Dekonjugation des Ubiquitin geschieht mit Hilfe der uCaM-Isopeptidase. Die Isopeptidase ist in Gegenwart von Calcium inaktiv. Die Abbildung erfolgte entsprechend der Darstellung Jennissens (Jennissen 1995).

Weiterhin wurde eine zweite Komponente, die uCaM Syn-F2, angereichert, diese wiederum bindet Calmodulin und überträgt es auf Ubiquitin (Majetschak et al. 1998b, Laub et al. 1998). Ubiquitin, eines der Substrate der uCaM-Synthetase, ist ein kleines (8,5 kDa), hitzeresistentes Polypeptid, das erstmalig im Thymusgewebe der Maus (Goldstein et al. 1975) isoliert wurde. In der weiteren Folge wurde Ubiquitin in allen untersuchten Eukaryonten, Prokaryonten (daher auch „Ubiquitin“ entsprechend seinem ubiquitären Vorkommen) und in den verschiedensten Geweben nachgewiesen (Özkaynak et al. 1984, Mayer und Doherty 1991, Durner und Böger 1995). Ubiquitin weist im Stoffwechselkreislauf grundsätzlich zwei unterschiedliche Funktionen auf: eine katabole oder eine nicht-katabole Funktion. Eine Einführung in diese beiden unterschiedlichen Funktionen des Ubiquitins bietet die Übersichtsarbeit von Jennissen (Jennissen 1995). Die Ubiquitylierung des Calmodulins (Abb. 1) ist ein Beispiel für die "nicht-katabole" Funktion. Calmodulin wird ubiquityliert, ohne dass es in der weiteren Folge proteolytisch degradiert wird.

Im katabolen Stoffwechselkreislauf hingegen werden die ubiquitylierten Proteine proteolytisch abgebaut.

Diese katabole Funktion wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Wilkinson et al. 1980, Stryer 2003, Michalek et al. 1993, Ciechanover und Schwartz 1994). Unter anderem werden ubiquitylierte Proteine in Proteasomen abgebaut (Hochstrasser 2002). Die Deubiquitylierung von zuvor ubiquitylierten Proteinen stellt einen notwendigen Schritt im proteolytischen Abbau dar (Verma et al. 2002, Yao und Cohen 2002). Im Folgendem werden einige weitere Beispiele für die verschiedenen Funktionen des Ubiquitins genannt: Dem Ubiquitin wird eine Rolle zugesprochen bei der Regulation von Onkogenen wie c-myc (Von Der Lehr et al. 2003), anderen Regulatoren des Zellzyklus wie zum Beispiel p21 (Bloom et al. 2003) oder Cyclin (Glutzer et al. 1991; Bastians et al. 1999). Weiterhin ist Ubiquitin beteiligt am Abbau von Interleukinen und dessen Rezeptoren (Jensen und Whitehead 2003). Ubiquitin ist eines der vermehrt exprimierten „Heat-shock“-Proteine im Rahmen der Stressantwort der Zelle (Bond und Schlesinger 1985; Liu et al. 1996).

Es dient als negativer Marker beim Brustkrebs (Iwaya et al. 2003), ist ein Bestandteil der Fibrillen des M. Alzheimer, der Pick- und Lewy-Korpuskel des M. Picks bzw. M.

Parkinson (Schäfer und Redies 1995) sowie der Mallory-Körperchen der alkoholinduzierten Leberzirrhose (Schäfer und Redies 1995).

Neben zahlreichen weiteren Beispielen wurden folgende Proteine als Substrate der Ubiquitylierung nachgewiesen: Myosin-Leichtketten (Laub und Jennissen 1991), Platelet-Derived-Growth-Faktor (PDGF)- β - Rezeptor (Mori et al. 1993), T-Zell-Antigen-Rezeptor (Cenciarelli et al. 1993), Ankyrin (Chang et al. 2004) und der Anaphase-Protein-Komplex (Gmachl et al. 2004).

Ein Cosubstrat der Ubiquityl-Calmodulin Synthetase ist Calmodulin (Calcium-Modulator-Protein). Calmodulin ist ähnlich wie Ubiquitin ein kleines (m: 16,7 kDa), hitzeresistentes Protein, welches in den verschiedensten Organismen wie Einzellern, Pflanzen und Tieren nachgewiesen wurde (Chafouleas et al. 1979; Hubbard et al. 1982; Klee und Vanaman 1982; Lukas et al. 1984). Kohse und Heilmeyer wiesen (Kohse und Heilmeyer 1981) für Calmodulin vier Bindungsstellen für Calcium nach, darunter zwei hochaffine Bindungsstellen (K_m : 4 μ M). Durch Bindung von Calcium an diese Bindungsstellen verändert sich die Konformation des Calmodulins. Die Konformationsänderung des Calmodulins wiederum beeinflusst und reguliert die Funktion verschiedener intrazellulärer Enzyme, darunter Glykogen-Synthetase, Myosin-Leichtkettenkinase, die Phosphorylase Kinase, Phosphodiesterase und Adenylat-cyclase (Stryer 2003). Bedingt durch seine Funktion als Calcium-Sensor ist Calmodulin auch an der Regulation einer Vielzahl von calciumabhängigen Kanälen beteiligt, darunter dem N-Methyl-D-aspartate Rezeptor (Akyol et al. 2003).

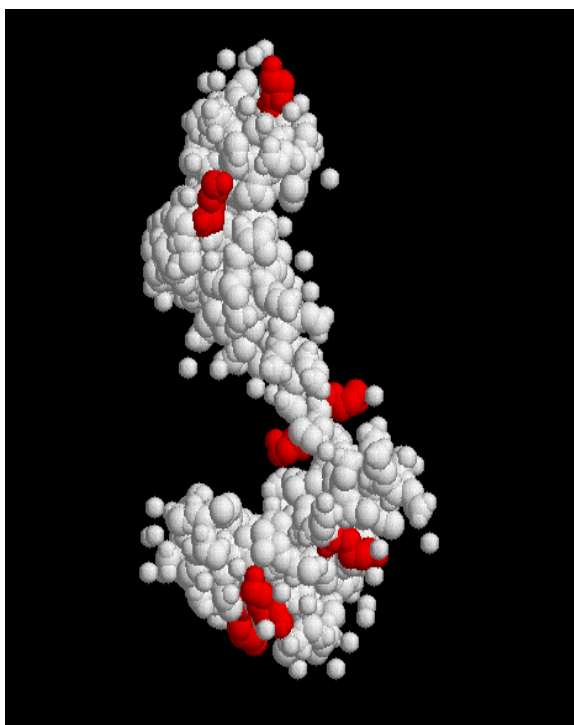
Calmodulin greift in den Zellzyklus ein, indem es verschiedene Phosphatasen und Kinasen reguliert, die wiederum verschiedene Faktoren der Mitose regulieren (z.B. Cdc2/cyclin B Kinase, Hutchins et al. 2003) oder die Replikation der Zentrosomen beeinflussen (Arlot-Bonnemains und Prigent 2002).

Da ein Gegenstand dieser Dissertation die orientierte Immobilisierung des Calmodulins ist, werden kurz die Ergebnisse der Röntgenstruktur- sowie NMR-Untersuchung des Calmodulins dargestellt. Die Röntgenstrukturanalyse liefert ein Beugungsbild des jeweiligen Portekristalls. Die NMR-Methode hingegen misst den chemischen Shift eines Atoms mit einem Spin ungleich Null (Thompson 2002).

Die Arbeitsgruppen Babu und Goldberg (Babu et al. 1988; Goldberg et al. 1996) lieferten wesentliche Ergebnisse und Interpretationen der Röntgenstruktur- und NMR-Untersuchung des Calmodulins; diese 3D-Ergebnisse stehen als graphische Dateien unter der

Internetadresse <http://www.expasy.org/> zur Verfügung. Abb. 2 stellt ein solches 3-D-Modell der Röntgenstrukturanalyse des wassergelösten Calmodulins in Gegenwart von Calcium dar (zur weiteren Erläuterung s. Material und Methoden-Teil). Wie aus der Abb. 2 hervorgeht, sind zwei Domänen des Calmodulins durch eine α -Helix miteinander verbunden. Die Bindungsstellen des Calciums sind mit I-IV gekennzeichnet. Diese Darstellung stimmt jedoch nicht vollständig mit der In-vivo-Struktur überein. Bedingt durch die Modifikationen der Kristallisation erscheint die α -Helix, die die beiden Calcium-bindende Domänen verbindet, starrer als es den tatsächlichen Gegebenheiten entspricht. Die in Abb. 3 gezeigte 3-D-Struktur einer NMR-Untersuchung stellt die Interaktion von Calmodulin mit einem calmodulinbindenden Protein (in diesem Falle Myosin-Leichtkette) dar. Die Magnetresonanzuntersuchungsmethode gibt die tatsächlichen Gegebenheiten wirklichkeitsgetreuer wieder als die Röntgenstrukturanalyse. Die in Abb. 2 dargestellte α -Helix „beugt“ sich und die zuvor beschriebenen Domänen bilden gleichsam eine Röhre, mit der sie die Myosin-Leichtkette umhüllen (Abb. 3).

A Kalottenmodell



B Peptid backbone

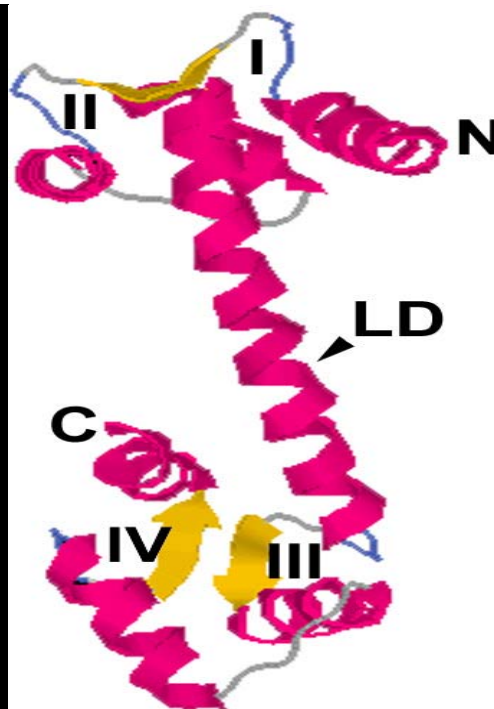


Abb. 2: Röntgenstrukturanalyse des Calmodulins in Gegenwart von Calcium

Dargestellt ist die Struktur des Calmodulins beruhend auf den Ergebnissen der Kristall-Röntgenstrukturanalyse (Babu et al. 1988).

A: Kalottenmodell: Dargestellt ist das Kalottenmodell des Calmodulins. Calmodulin wird, wie in den folgenden Kapiteln dargestellt, über die Aminogruppe eines der sieben

Lysinseitenketten an die Divinylsepharose gekoppelt. Die entsprechenden Lysine sind rot markiert. Die Abbildungen entstammen dem Programm „Ras-Mol“ (Sayle und Milner-White 1995).

B: Peptid Backbone: *Dargestellt ist ein schematisches Bild (Peptid-backbone) des Calmodulins mit den wesentlichen Sekundärstrukturen (Zielinski 1998). Die Calcium-bindenden Domänen sind mit I-IV gekennzeichnet. Die an den jeweiligen Enden dargestellten α -Helices treten später mit den calmodulinbindenden Proteinen in Interaktion. Verbunden sind diese Komponenten durch die Linker-Domäne. Bedingt durch die Vorgänge der Kristallisation entspricht diese Domäne nicht in Gänze den tatsächlichen Verhältnissen.*

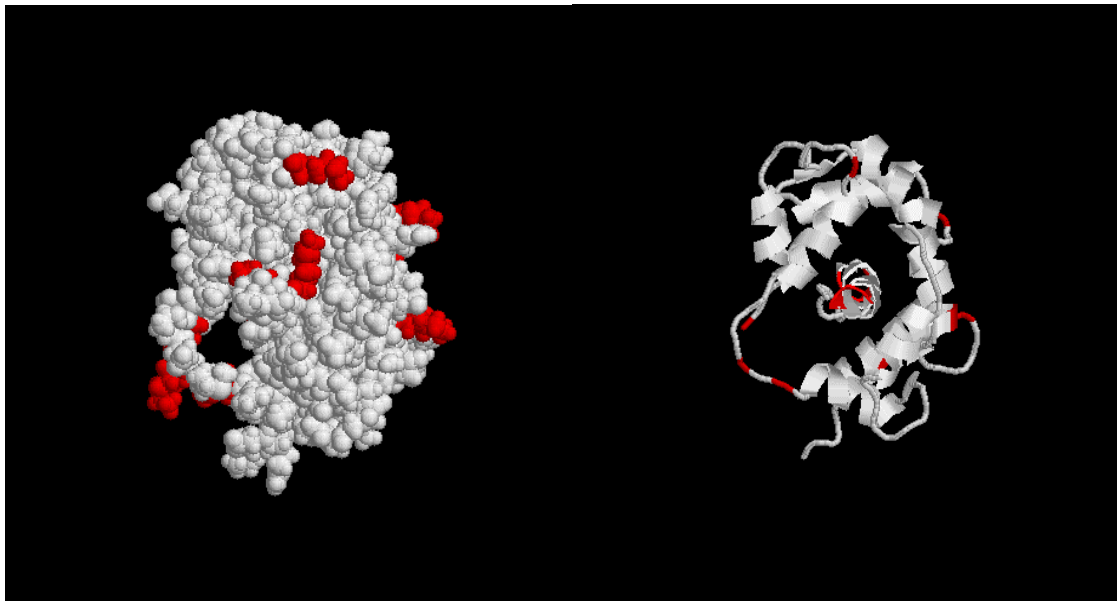


Abb. 3: NMR-Untersuchung des Calmodulin in Interaktion mit Myosin-Leicht-Kette in Gegenwart von Calcium

Die Abbildung stellt die NMR-Strukturuntersuchungsergebnisse der Interaktion des Calmodulins mit der Myosin-Leichtkette dar (Goldberg et al. 1998). Die in Abb. 2 dargestellte α -Helix beugt sich und die in der Abbildung 2 dargestellten Domänen I-IV umhüllen das calmodulinbindende Protein.

Wäre diese „Röhre“ durch sterische Ausrichtungen blockiert, so könnten calmodulinbindende Proteine nicht gebunden werden.

Affinitätschromatographische Aufreinigungen von Proteinen auf immobilisiertem Calmodulin wurden von mehreren Gruppen durchgeführt; unter anderem die Gruppe Depaoli-Roach (Depaoli et al. 1979) und Jennissen und Botzet (Jennissen und Botzet 1993). In diesen Fällen wurde Calmodulin ungerichtet über die Aminogruppe einer Lysinseitenkette immobilisiert. Die sieben verschiedenen Lysine des Calmodulins sind in Abb. 2 und 3 rot hervorgehoben. Anzumerken ist, dass Lys 115 des Calmodulins jedoch durch eine Trimethylgruppe blockiert.

Der Ablauf der ungerichteten Kopplung des Calmodulins an die Sepharose ist in Kapitel 3.1 dargestellt. Unter der Annahme, dass alle sechs Lysine des Calmodulins mit der

gleichen Wahrscheinlichkeit an die Sepharose gebunden werden können, würden sich sechs verschiedene räumliche Positionen ergeben. Auch wenn die Tertiärstruktur des Calmodulins nach der Immobilisierung in der Weise erhalten bleibt, dass es prinzipiell andere Proteine binden würde, könnten dennoch einige dieser Orientierungen die Interaktion von Calmodulin mit calmodulinbindenden Proteinen erschweren. Dies könnte unter anderem dadurch erfolgen, dass die in Abb. 3 dargestellten „Röhre“ durch die Immobilisierung nicht mehr für andere Proteine zugänglich ist und somit andere calmodulinbindende Proteine nicht mehr gebunden werden. Durch gerichtete Immobilisierung, zum Beispiel durch Verwendung des oben beschriebenen Fusionsproteinsystems, könnten sterische Hemmnisse umgangen werden.

Folgende Fragestellung soll im Rahmen dieser Dissertation beantwortet werden:

Kann durch die gerichtete Immobilisierung eine Verbesserung der Affinitätschromatographie auf Calmodulin erbracht werden? Als „Assay“ dient dazu die Anreicherung der uCaM Syn-F2.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Aceton, Acrylamid (Fa. Roth, Karlsruhe), Alkoholdehydrogenase, Ampicillin, Ammoniumperoxisulfat, Benzol (Fa. Sigma, München), Bolton-Hunter-Reagent (Fa. Amersham, Braunschweig), Borsäure, Bovines Serumalbumin (alle Fa. Sigma, München), Bromphenolblau (Fa. Serva, Heidelberg) 1,4 Butandioldiglycidether, Calciumchlorid (alle Fa. Sigma, München), Calmodulin (eigene Präparation), Carboanhydrase (Fa. Sigma, München), Chloramin T (Fa. Serva, Heidelberg), Coomasie-Blau (Serva Blue R, Fa. Serva, Heidelberg), 2-Desoxy-D-Glukose, Dikaliumhydrogenphosphat, Dinatriumkarbonat, Dinatriumtartrat, Dioxan, DTE (Dithiothreitol) (alle Fa. Sigma, München), EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz, Fa. Serva, Heidelberg), EGTA (Ethylenglykolbis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure; Fa. Serva, Heidelberg), Ferritin (Fa. Sigma, München), Folin-Ciocalteus-Reagenz (Fa. Merck, Darmstadt), Glutathion (Fa. Sigma, München), Glutathion-Sepharose (eigene Präparation), Glycerin, Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (alle Fa. Sigma, München), Hefe-Extrakt (Fa. Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz), Immunoglobulin G (Fa. Sigma, München), IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid, Fa. Roche, Mannheim), Kaliumdihydrogen-phosphat, Kaliumjodid, Kalziumdichlorid, Kupfersulfat, Lactalbumin (alle Fa. Sigma, München), Leupeptin (Fa. Biomol, Ilvesheim), Lysozym (Fa. Sigma, München), Mercaptoethanol, Methanol, Methylenbisacrylamid (alle Fa. Serva, Heidelberg), Milchprotein (Fa. Töpfer, Dittmansried), Natriumborhydrid, Natriumchlorid, Natriumhydrogenphosphat, Natriumhydroxid, Natriummetabisulfit, Ovalbumin (alle Fa. Sigma, München, Pentobarbiturat-Natrium (Nembutal®, Fa. Sanofia-Leva, Hannover), Phenylhydrazin (Fa. Serva, Heidelberg), Phosphorylase b (eigene Präparation), Phosphorylase Kinase (eigene Präparation), PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, Fa. Serva, Heidelberg), SDS (Natriumlaurylsulfat, Fa. Roth, Karlsruhe), TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin), Thyreoglobulin (alle Fa. Sigma, München), Trichloressigsäure (Fa. Serva, Heidelberg), Tris (Tris-hydroxy-aminomethan (Fa. Biomol, Ilvesheim), Triton 100 (Fa. Fluka, Bruchs, Schweiz), Trypsininhibitor (Fa. Biomol, Ilvesheim), Trypsinogen (Fa. Sigma, München), Trypton (Fa. Fluka, BioChemika, Buchs, Schweiz), Ubiquitin (Fa. Sigma, München).

2.2 Präparative Methoden

2.2.1. Herstellung von Roh-uCaM-Synthetase

2.2.1.1 Induktion einer Retikulozytose

Nach der Methode von Gehrke und Jennissen (Gehrke et al. 1987) wurde bei ca. sechs Monate alten Kaninchen des Stammes CHBBch (mit einem Ausgangsgewicht von ca. 2-4 kg) durch subkutane Injektion von Phenylhydrazin (2,5 % v/v in 0,9% w/v NaCl, pH. 7,4) im Schulter- und Nackenbereich eine Retikulozytose ausgelöst. An den Tagen 1-4 wurden 0,22 ml/kg und am 5. Tag 0,13/kg der Phenylhydrazin-Lösung appliziert. Am 8. Tag wurden die Tiere durch Injektion von 3 ml Pentobarbiturat-Na (Nembutal®) in die V. auricularis magna narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose wurden die Aa. carotis communis eröffnet und das Blut nach Vorlage von 1 ml 1M Na-Citrat (pH. 7,4) pro 100 ml Blut in einem silikonisiertem Becher (Siliko-Spray, Fa W. Rüscher, Rommelshausen) aufgefangen.

2.2.1.2 Lysatpräparation aus Retikulozyten

Die Präparation erfolgte in Anlehnung an die Methode von Gehrke und Jennissen (Gehrke et al. 1987), welche eine Modifikation der Veröffentlichung von Ciechanover (Ciechanover et al. 1982) darstellt. Das in 2.2.1.1 erhaltene Blut wurde zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge Rotor 6, 465 ml, 2500 g, 30 min 5 °C), der Überstand abgesaugt und das so gewonnene Pellet im zehnfachen Volumen 10 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , 150 mM NaCl, pH. 7,4 resuspendiert. Der obige Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Die erhaltene Retikulozytenfraktion wurde ATP depletiert, indem dem Pellet in einem Zell zu Pufferverhältnis von 1:1 10 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 20mM 2-desoxy-D-Glucose und 0,2 mM Dinitrophenol pH. 7,4 beigemischt wurde. Nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurden die erhaltenen Retikulozyten erneut wie oben beschrieben gewaschen und inkubiert. Die Lyse des so aufgearbeiteten Retikulozytenpellets erfolgte durch Zugabe einer 1,66 mM DTE-Lösung, die dem 2,5 fache Pelletvolumen entsprach. Die hypotone Lyse wurde durch deutlichen Farbumschlag nach rot sichtbar. Die korpuskulären Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation bei 80.000 g (ZU 18-70, Fa Beckmann, München) abgetrennt. Der Ultrazentrifugenüberstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Aufreinigung von Calmodulin aus Rinderhoden

Die Isolierung des Calmodulins aus Rinderhoden wurde freundlicherweise von Frau Botzet nach der Methode von Jennissen (Jennissen und Botzet 1993) durchgeführt.

2.2.3 Herstellung von kaltem Calmodulin, modifiziert nach der Methode von Bolton und Hunter (BH-Calmodulin)

Die Präparation wurde entsprechend der Methode von Ziegenhagen (Ziegenhagen et al. 1988) durchgeführt, welche eine Modifikation der Vorgehensweise von Bolton und Hunter (Bolton und Hunter 1973) darstellt.

13,1 mg Bolton-Hunter-Reagent wurden 5,2 ml Benzol (wasserfrei gelagert auf Molekularsieb) und 0,311 ml Dioxan (gelagert auf Natriumdraht) zugefügt und die Lösung im Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur und unter Vakuum eingedampft.

So dann wurden 16 ml Calmodulinlösung (0,5 mg/ml gelöst in 125 mM Borsäure, pH 8,4) der Lösung beigemischt, 30 min unter langsamen Schütteln auf Eis inkubiert und schließlich 1,8 ml 2 M Glycin, 0,1 mM CaCl_2 pH 7,0 zugefügt. Nach entsprechender TCA-Fällung wurde das erhaltene Pellet auf 2 ml 10mM GP, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,0 umdialysiert.

2.2.4 Radioaktive Markierung von Calmodulin mit ^{125}I nach der Methode von Bolton und Hunter (BH-Calmodulin)

Entsprechend der Publikation von Ziegenhagen (Ziegenhagen et al. 1988), welche eine Modifikation der Methode von Bolton (Bolton und Hunter 1973) darstellt, wurden 1 mCi BH-Reagenz 30 min unter Stickstoff eingedampft (entspricht 455 pMol BH-Reagenz). Dann wurde 15,3 μl Calmodulinlösung (0,5 mg/ml) (entspricht 455 pMol Calmodulin) hinzugefügt und das Gemisch 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Daraufhin dann erfolgte die Zugabe von 0,15 ml folgender Lösung: 0,2 M Glycerin gelöst in 125 mM Borsäure pH. 8,4. Anschließend wurde die Probe 30 min auf Eis gelegt. Schließlich wurden 151 μl kaltes BH-Calmodulin zugefügt (3,3 mg/ml; entspricht 500 μg).

Nach TCA-Fällung wurde das Pellet zweimal mit 0,5 ml eiskalter Acetonlösung (-20 °C) gewaschen, mit 1M GP neutralisiert und in 0,3 ml eines Puffers mit 10mM GP, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,0 aufgelöst.

Der Lösung wurde ein Aliquot entnommen und mittels TCA-Fällung die Einbaurate bestimmt, indem getrennt die Strahlungsaktivitäten des Überstandes und des Pellets bestimmt wurden. Es ergab sich eine Einbaurate von ca. 85 %.

2.2.5 Radioaktive Markierung von Ubiquitin mit ^{125}I od

Die Kopplung vom radioaktiven Jod an Ubiquitin beruhte auf der Methode von Gehrke und Jennissen (Gehrke et al. 1987). Nach Vorlage von 139 μl Ubiquitinlösung (65 mg/ml), 45 μl 1M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5 und 90 μl Na^{125}I (9 mCi, Fa. Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) in einem Eppendorfröhrchen (Qualicup) wurde die Reaktion durch Zugabe von 45 μl Chloramin T (2 mg/ml) gestartet und nach 90 Sekunden durch Zugabe von 45 μl Natriummetabisulfit (2 mg/ml) und 900 μl KJ (10 mg/ml, ebenso wie Natriummetabisulfit und Chloramin T gelöst in 150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5) gestoppt. Abschließend wurden 140 μl 20 mM Tris/HCl pH 7,5 zugefügt.

Die Lösung wurde dreimal jeweils eine Stunde gegen 5 l 20 mM Tris/HCl pH: 7,5 dialysiert und nach entsprechender Aliquotierung im flüssigen Stickstoff gelagert. Die Proteinausbeute betrug durchschnittlich 60%, die Radioaktivitätsausbeute durchschnittlich 80%.

2.2.6 Herstellung der Ubiquitin-Sepharose (Ubi-Seph)

Die folgende Präparation wurde entsprechend der Veröffentlichung Majetschaks (Majetschak et al. 1998b) durchgeführt.

Ubiquitin-Sepharose wurde nach der von Sairam und Porath beschriebenen Methode (Sairam und Porath 1976) aktiviert. Zunächst wurden 70 g abgenutzte Sepharose in 1,2 l Aqua Bidest aufgelöst, abgenutzt und das so erhaltene Gel in 70 ml 0,5 M Na_2CO_3 , pH 11 resuspendiert. Die Aktivierung erfolgte durch Zugabe von 4 ml Divinylsulfon (DVS); während der anschließenden vierstündigen Inkubation wurden alle 10 Minuten 0,2 ml Divinylsulfon hinzugefügt. Im Weiteren wurde das Gel solange gewaschen, bis die Suspensionslösung einen pH-Wert von 7 aufwies. Abschließend wurde mit 100 ml Aceton und 100 ml Wasser nachgewaschen.

Die so erhaltene DVS-aktivierte Sepharose 4B wurde gemäß der Publikation von Gehrke (Gehrke et al. 1987) mit 0,2 M NaHCO_3 äquilibriert, dann in einem Verhältnis von 1:1 (w/v) mit einer Ubiquitinlösung (6,5 mg/ml gelöst in 0,2 M NaHCO_3 , pH 9,5) vermischt und vier Stunden bei Raumtemperatur unter langsamen Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Suspension weitere 15 Stunden bei 5 °C gerührt. Nach Abschluss der Inkubation wurde die Suspension genutscht, zur Beendigung der Kopplungsreaktion dem Gel 0,2 M NaHCO_3 , pH 9,5 in einem Verhältnis von 1:1 (v/w) zugesetzt und die Suspension vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Waschung des Gels mit 100-fachen Gelvolumen Wasser und 100-fachen Gelvolumen 20 mM Tris/HCl stand es bereit für weitere Präparationen. Die so erhaltene Ubiquitin-Sepharose wies einen Substitutionsgrad von 5,9 mg Ubiquitin pro ml gepacktes Gel auf.

2.2.7 Synthese von Glutathion-Sepharose

Die Kopplung des Glutathions an die Sepharose erfolgte entsprechend der Modifikation von Dr. T. Zumbink (unpubliziert), welche auf der von Sundberg und Porath (Sundberg und Porath 1974) beschriebenen Methode beruht.

Nach Auflösung von 50 g Agarose in 1 l Aqua bidest wurde die Suspension mit ml 0,6 N NaOH und 92 mg Natriumborhydrid versetzt und anschließend gerührt. In einem weiteren Schritt wurden 50 ml 1,4 Butandiolglycidether langsam hinzugefügt und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur fortgeführt. Am nächsten Tag wurde die Agarose mit 2 l Wasser gewaschen. Sodann wurde die Sepharose mit 500 ml 0,1 M $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ (di-Natrium-hydrogenphosphat) 1 mM EDTA pH 7,0 gewaschen, abgefritet und nochmals mit 300 ml des oben beschriebenen Phosphatpuffers gewaschen.

Fünf Gramm Glutathion wurden in 62 ml des Phosphat-und EDTA Puffers gelöst. Die Lösung wurde dem Gel hinzugefügt und auf pH 7,0 eingestellt. Nach sechsstündigem Rühren wurde das Gel abgefritet und mit einem Liter Wasser und 1 l Phosphatpuffer gewaschen und in 10 % Ethanol Wasser (v/v) gelagert.

2.2.8 Molekularbiologische Synthese des Glutathion-S-Transferase-Calmodulins (GST-Calmodulin) aus E.coli

Glutathion-S-Transferase wurde in einer Bakterienkultur hergestellt (Laub et al. 1998). Das Einbringen des Vektors in das Bakterium sowie die Auswahl des geeigneten Klons wurde von Dr. Stepphuhn durchgeführt, dem ich für diese Arbeit zu Dank verpflichtet bin.

Je 20 µl eines E.coli Stammes (f36 CpgEx Bam Sol 5 Alpha Nr. 10; von Herrn Dr. Stepphuhn freundlich zur Verfügung gestellt) wurden in 3 ml 2YT Lösung (16 g/l Trypton; 10g/l Hefe Extrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0; 50µg/ml Ampicillin) angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zwei 5 l Glaskolben bei trockener Hitze sterilisiert und mit 3 l der obigen 2YT Lösung (eingestellt auf 50µg/ml Ampicillin) befüllt. Die Vorkultur wurde in den Kolben überführt und der Extinktionsleerwert dieser Lösung photometrisch bestimmt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurde halbstündlich die Extinktion der Kultur bestimmt. Nachdem die Lösung einen Extinktionswert von 0,6 aufwies, wurde die Kultur auf 1mM IPTG Endkonzentration eingestellt und über Nacht weiter bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Bakterien abzentrifugiert (Beckmannzentrifuge JA 10 Rotor, 7000g 4°C 15 min), der Überstand abgegossen und das Pellet in 50 mM Tris, 100 mM NaCl pH 8,0 gelöst. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Das dabei erhaltene Pellet wurde in einer möglichst geringen Menge PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaHPO₄ 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gelöst. Dieser Lösung wurde Lysozym bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml hinzugefügt, für ca. 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und bei -80 °C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurde die Flüssigkeit mit dem Ultrathorax fünf verschiedene Male je eine Minute lang aufgeschlossen und schließlich 60 Minuten zentrifugiert (Beckmannzentrifuge, 28000 rpm, 80 000 g, 4°C). Der Überstand und Pellet wurden bei -80 °C eingefroren. Glutathion-S-Transferase-Calmodulin wird im Folgenden GST-Calmodulin genannt.

2.2.9 Herstellung von Glutathion-S-Transferase-Calmodulin-Sepharose (GST-Calmodulin-Sepharose)

Nach der in 2.2.7 beschriebenen Synthese von Glutathion-Sepharose wurden 25 ml Glutathion-Sepharose für die Herstellung von GST-Calmodulin-Sepharose verwendet.

Hierzu wurde eine Säule mit Glutathion-Sepharose gepackt (Innendurchmesser 2,5 cm, 5,8 cm Höhe) und mit dem 10 fachen Säulenvolumen PBS, 1 % Triton äquilibriert. Zur Beladung des Gels mit dem Fusionsprotein GST-Calmodulin wurden 20 mg Ultrazentrifugenüberstand (mit einem GST-Calmodulin Anteil von ca. 40 %, s. 2.2.8) pro ml Gelvolumen mit einer Auftragsgeschwindigkeit von 90 ml/h aufgetragen. Zuvor wurde die Auftragslösung durch Zugabe von PBS und Triton 100 auf 1,4 mg/ml Proteinendkonzentration und 1 % Triton 100 eingestellt. Nach dem Auftrag des Fusionsproteins wurde die Säule mit dem fünffachen Säulenvolumen PBS, 1 % Triton 100 gewaschen und schließlich mit dem 10 fachen Säulenvolumen PBS äquilibriert. Der Säule wurde 1 ml Gel entnommen und die immobilisierte GST-Calmodulinmenge durch Auftrag von 8 ml Glutathion bestimmt. Glutathion verdrängt GST-Calmodulin spezifisch. Die immobilisierte GST-Calmodulinmenge betrug ca. 4-5,5 mg/ml packed Gel (s. Tab. 2). Der Anteil der unspezifisch gebundenen Proteine wurde durch Auftrag von 1 % SDS bestimmt.

2.2.10 Präparation von Calmodulin-Sepharose nach der Divinylsulfon-Aktivierungsmethode (DVS-Calmodulin)

Calmodulin-Sepharose 4B wurde freundlicherweise von G. Botzet und H.P. Jennissen nach der Methode von Jennissen und Botzet (Jennissen und Botzet 1993) hergestellt. Der Substitutionsgrad betrug 4,1 mg Calmodulin/ml gepacktes Gel.

2.3 **Chromatographische Methoden**

2.3.1.1 Herstellung von APFII aus Retikulozytenlysat auf Fractogel EMD-DEAE 650 (S)

Gemäß der von Gehrke (Gehrke et al. 1987) und Hershko (Hershko et al. 1986) beschriebenen Vorgehensweise, welche eine Variation der Veröffentlichung von Ciechanover (Ciechanover et al. 1982) darstellt, wurden eine Hauptsäule (Superperformance Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg, Innendurchmesser 3,1 cm, Höhe 2,6 cm, 16 ml packed EMD-DEAE 650 (S) Fractogel, Fa. Amersham, Braunschweig) und eine ihr vorgeschalteten Vorsäule (4 ml packed Gel HWK-65 (S), Fa. Hitachi) verwendet.

Die Säulen wurden zunächst mit dem 10-fachen Säulenvolumen des Phosphatpuffers 3 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 1 mM DTE pH 7,0 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin äquibriert. So dann wurde Lysat (s. 2.2.1.2) (364 ml, 59mg/ml) aufgetragen. Es wurden 1300 mg Lysat/ml packed Gel mit einer Geschwindigkeit von 75 ml/h aufgetragen. Nach Beendigung des Auftrages wurde mit dem 7-fachen Säulenvolumen des Äquibrierungspuffer mit einer Geschwindigkeit von 75 ml/h gewaschen und schließlich mit 20 mM Tris, 500 mM KCl, 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 0,1mM PMSF, 0,1 mg/ml Trypsininhibitor eluiert. Der Elutionsvorgang wurde photometrisch aufgezeichnet und in Fraktionen zu 12 ml aufgefangen. Die Fraktionen, die sich um den Extinktionsmaximum gruppierten, wurden gepoolt und für die weitere Aufreinigung verwendet. Das so gewonnene Eluat wird mit APFII abgekürzt.

2.3.1.2 Affinitätschromatographie auf Ubiquitin-Sepharose 4B

Die Affinitätschromatographie beruht auf der Methode von Gehrke und Jennissen (Gehrke et al. 1987). Die Säule hatte folgende Maße: Innendurchmesser 2,5 cm, Höhe 5,8 cm. Die Säule wurde bei 4°C im Kühlraum mit 10-fachen Säulenvolumen des Puffers 50 mM Tris/HCl, 5mM ATP, 10 mM MgCl_2 äquibriert

31 ml der Auftragslösung (8,6 mg/ml APFII, s. 2.3.1.1) wurde auf 5mM ATP, 10 mM MgCl_2 eingestellt und mit einer Pumpgeschwindigkeit von 25 ml/h auf die Ubiquitin-Sepharose aufgetragen. Nach Abschluss des Auftrages wurde mit dem dreifachen Säulenvolumen des Äquibrierungspuffer nachgewaschen. Der dabei erhaltene Durchlauf, welcher im Folgendem mit Ubi-Seph-D bezeichnet wird, wurde für weitere Präparationen aufgehoben und eingefroren. Anschließend erfolgte die Elution der Ubiquityl-Calmodulin Synthetase Faktor 1 (uCaM Syn-F1) mit dem fünffachen Säulenvolumen 50 mM Tris/HCl, 10mM DTE, 0,1 mM EDTA, pH 9. Die Elutionsfraktion wurde gegen 20 mM Tris/ HCl, 1mM DTE, PH 7,6 umdialysiert, auf 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin eingestellt und bei – 80 °C eingefroren.

2.3.1.3 Affinitätschromatographie auf DVS-Calmodulin-Sepharose

Die Affinitätschromatographie auf DVS-Calmodulin-Sepharose erfolgte entsprechend der Methode Majetschaks (Majetschak et al. 1998b). Die Säule hatte folgende Maße: Innendurchmesser 2,5 cm, Höhe 5,8 cm. Die Säule wurden mit 250 ml des Waschpuffers (50 mM GP, 10 % Sucrose, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin,

0,01 mM PMSF, 5 µg/ml Trypsininhibitor pH 7,0) mit einer Pumpgeschwindigkeit von 90 ml/h äquilibriert. Danach wurde der Auftrag (U-Seph-D) auf eine Calciumkonzentration von 1 mM Calciumchlorid eingestellt und mit einer Pumpgeschwindigkeit von 70 ml/h aufgetragen. Nach Beendigung des Auftrags wurde mit 125 ml des oben beschriebenen Waschpuffers nachgewaschen. Die Elution der uCaM Syn-F2 erfolgte durch folgenden Elutionspuffer: 50 mM GP, 5 mM MgCl₂, 2mM EDTA, 5 mM EGTA, 5µg/ml Leupeptin, 0,01 mM PMSF pH: 7,0) eluiert. Das erhaltene Eluat wurde mit Vivaspin (30 kDa, Fa. Millipore) ankonzentriert, mit 20 mM Tris/HCl, 1mM DTE, 5 µg/ml Leupeptin, 0,01 mM PMSF umdialysiert und bei -80°C eingefroren.

2.3.1.4 Anionenaustauschchromatographie auf MonoQ HR 5/5

Die Anionenaustauschchromatographie auf MonoQ-Gel erfolgte auf der Grundlage der Arbeiten Majetschaks (Majetschak et al. 1998a, Majetschak et al. 1998b).

Die MonoQ HR 5/5 Säule (Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg; 0,5 cm I.D., 5 cm Gelhöhe) wurde mit 20 mM Tris/ HCl, 1mM DTE, 5µg/ml Leupeptin, 0,01 mM PMSF, 5µg/ml Trypsininhibitor äquilibriert. Der MonoQ-Säule war eine Vorsäule (1 ml HWK 65 (S); 0,5 cm Innendurchmesser, 1 cm Gelhöhe, Fa. Hitachi) vorgeschaltet. Die Chromatographie erfolgte auf einem Äkta-Prime Gerät (Fa. Amersham, Braunschweig). Das Äkta Prime Gerät besteht aus einem Durchflussphotometer, einer Pumpe, einem Fraktionssammler und einem Steuerungsgerät, das diese einzelnen Komponenten steuert.

Die gesamte Apparatur befand sich im Kühlraum bei 5 °C. Die Pumpgeschwindigkeit variierte zwischen 8 ml/h und 15 ml/h, der Säulendruck zwischen 7 und 20 bar. Der Auftrag wurde in einer 5 ml Einmalspritze aufgenommen und mittels des Rheodyne Injektors (Rheodyne Injektor 9125 Fa. Pharmacia-Amersham, Braunschweig) auf die Probenschleife (Superloop 10 ml, Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg) aufgetragen; die Angaben bezüglich KCl Gradienten, Pumpgeschwindigkeiten, Auftragsvolumina und Konzentrationen sind bei den jeweiligen Versuchen aufgeführt.

Der KCl-Gradient wurde zusätzlich mit dem Handmessgerät (s. 2.4.6) gemessen.

2.3.1.5 Gelfiltration auf Superose 6.p.g.

Die Gelfiltration wurde entsprechend der Methode von Majetschak (Majteschak et al. 1998a) auf Superose 6 p.g. bei 5°C mit folgender Säule durchgeführt (1,1 cm I.D., 25,17

ml Gel). Als Laufpuffer wurde 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1mM DTE, 5µg/ml Leupeptin; Pumpgeschwindigkeit 4,15 ml/h) verwendet. Nach Packung der Säule entsprechend der Anleitung der Firma Pharmacia wurde zunächst die Bodenzahl der Säule bestimmt. Diese erfolgte durch Auftrag von 500 µl 5mg/ml Azeton mit einer Pumpgeschwindigkeit von 60 ml/h. Die Extinktion wurde photometrisch bei 0,05 gemessen und mit einer Papiergeschwindigkeit von 2 mm/sec aufgezeichnet. Die anschließende Auswertung erfolgte bei halber Peakhöhe des Extinktionsverlaufes. Die zur Berechnung der Bodenzahl verwendete Formel lautet (s. Gl. 2):

$$\text{Bodenzahl} = \frac{5,54 \times 1000 \times (A / B)^2}{H} \quad (\text{Gl. 2})$$

Hierbei ist A die Strecke Start der Aufzeichnung bis zum Peak der Extionskurve in cm; B ist die Breite der Extinktionskurvenverlaufes bei halber Peakhöhe in cm und H die Höhe der Säule in mm. Die Bodenzahl betrug etwa 4500/m. Nach Bestimmung der Bodenzahl wurde die Säule durch folgende Standardproteine geeicht:

1. Thyreoglobulin (668 kDa), 2. Ferritin (446 kDa), 3. Katalase (232 kDa), 4. γ-Globulin (150 kDa), 5. Bovines Serumalbumin (BSA, 67 kDa), 6. Ovalbumin (45 kDa), 7. Trypsininhibitor (20,1 kDa), 8. Cytochrom c (12,4 kDa). Die Eichung erfolgte anhand der grafischen Auswertung des Extinktionsverlaufes gemessen bei 280 nm. Die grafische Auswertung des Elutionsvolumens V_e erfolgte als Halbwertsbreite bei 1/3 Höhe des Proteinpeaks.

Die Bestimmung des Ausschlussvolumens V_o erfolgte mit Dextran-Blue, die des Totalvolumens V_{total} mit DNP Alanin (beide Firma Serva Heidelberg).

Bei den Gelfiltrationsläufen, die ohne zusätzliche Proteasehemmer eingefroren wurden (s. Ergebnis-Teil 3.3), betrug V_o 11.5 ml und V_{total} 27,7 ml.

Bei den Läufen, die mit zusätzlichen Proteasehemmern eingefroren wurden (s. Ergebnis Teil 3.3), betrug V_o 9,3 ml und V_{total} 24 ml.

2.3.2. Chromatographie auf orientiert immobilisiertem Calmodulin

2.3.2.1 Affinitätschromatographie auf GST-Calmodulin-Sepharose

Die GST-Calmodulin-Sepharose (I.D. der Säule 2,5 cm, Höhe 5,8 cm) wurde mit 10 Säulenvolumina des Waschpuffers (50 mM GP, 10 % Sucrose, 2mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 0,01 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ Trypsininhibitor pH 7,0) mit einer Pumpgeschwindigkeit von 90 ml/h äquilibriert. Der Auftrag (Durchlauf der Ubiquitin-Sepharose-Säule, s. 2.3.1.2) wurde mit dem Äquilibrierungspuffer auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml und einer Calciumkonzentration von 1mM CaCl_2 eingestellt: Der Auftrag erfolgte mit einer Pumpgeschwindigkeit von 70 ml/h. Anschließend wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen Äquilibrierungspuffer nach-gewaschen und mit fünffachen Säulenvolumen Elutionspuffer (50 mM GP, 5 mM MgCl_2 , 2mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 0,01 mM PMSF pH: 7,0) eluiert. Das erhaltene Eluat wurde ankonzentriert (Vivaspin 30 kDa, Fa. Millipore), mit 20 mM Tris/HCl, 1mM DTE, 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 0,01 mM PMSF umdialysiert und bei -80°C eingefroren.

2.4 **Analytische Methoden**

2.4.1 Automatisierte Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt nach Lowry (Lowry et al. 1951). Um eventuell den Test störende Substanzen zu vermeiden, wurde die zu bestimmende Lösung mit TCA gefällt (Endkonzentration 5 % (w/v)), 20 Minuten auf Eis gelegt und abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5420, Fa. Eppendorf, 15 min bei 10.000 g). Das Pellet wurde aufgenommen in 1% SDS, 0,1 N NaOH. Nach Durchmischung der Proteinprobe mit dem gleichen Volumen 0,1 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ und 0,24 % (w/v) Dinatriumtartrat $\times 2 \text{H}_2\text{O}$ erfolgte nach einer Minute die Zugabe des 4,25-fachen Volumens 0,2 N NaOH, 2,12 % (w/v) Na_2CO_3 und nach einer weiteren Minute die Zugabe des gleichen Volumens Folin-Ciocalteus-Reagenz (1:4 verdünnt). Diese Vorgänge wurden automatisiert durch Auto-Analyzer (Fa Technikon, Bad Vibel) durchgeführt. Nach fünf Minuten Inkubation der Gemische erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei

660 nm im Zytometer. Zur Eichung des Tests wurden bei jeder Messreihe die Extinktionen von vier verschiedenen, bekannten BSA Lösungen bestimmt.

2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Gele wurden mit folgenden Stammlösungen gemäß Laemmli (Laemmli 1970) angesetzt:

1. 30 % (w/V) Acrylamid (AA), 0,8 % Methylenbisacrylamid
2. 1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
3. 0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
4. TEMED
5. 10 % (w/v) Ammoniumperoxisulfat (frisch angesetzt)

Die Lösungsansätze für Sammel- und Trenngele waren wie folgt:

Lösung	Sammelgel	Trenngele	
	4,5 % AA	10 % AA	15 % AA
1	6 ml	13,3 ml	20 ml
2		10 ml	10 ml
3	10 ml		
4	0,04 ml	0,04 ml	0,04 ml
5	0,12 ml	0,15 ml	0,15 ml
H ₂ O	24 ml	16,7 ml	10 ml

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten (Glasplatten: 10 cm x 18 cm x 0,5 cm, Abstand der Platten 1,5 mm; Anzahl der Zahntaschen 10; Zahnabstand 1,6 mm, Zahnbreite 6,6 mm, Zahntiefe 14,8 mm) mit Hilfe des vertikalen Gelelektrophoresesystems Protean (Fa. Biorad) gegossen. Zunächst wurde das entgaste Trenngel gegossen, dann wurde die Lösung mit ca. 0,3 ml Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde in entsprechender Weise mit dem Sammelgel verfahren und schließlich die Kämme eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Sammelgels wurden die Kämme entfernt und die freiwerdenden Räume mit Kammerpuffer befüllt (0,25 M Tris, 0,192 M Glycin und 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3). Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen (10 % Glycerin, 5 % ME, 2 % SDS, 0,001 % Bromphenolblau, 0,065 M Tris/ HCl, pH 6,8).

So dann wurden die Proteine ca. drei Stunden bei 80 mA und 190 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 Minuten in 0,25 % (w/v) Coomassie-Blau (Serva Blue R, Fa. Serva), 50 % Methanol, 9,2 % (v/v) Essigsäure unter Rütteln gefärbt und über Nacht in 7,5 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol entfärbt.

Die Gele wurden im Durchlicht mit einer Spiegelreflexkamera (bei folgender Einstellung: Blende: 8 oder 11 bei 1/8 bis 1/30 Sekunden Verschlusszeit) auf einen orthochromatischen Dokumentenfilm (Agfaortho 25 Professional, 15 DIN Empfindlichkeit, Fa. AGFA, Leverkusen) aufgenommen. Die Entwicklung der Filme erfolgte in einem Fotolabor.

Als Standards zur Eichung des molekularen Massen wurden folgende Proteine verwendet: Lactalbumin (14,2 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Carboanhydrase (29,2 kDa), Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, Ovalbumin (45 kDa), BSA (67 kDa), Phosphorylase b (96 kDa), Phosphorylase-Kinase (α : 138 kDa, β : 125 kDa, γ : 45 kDa, δ : 17,5 kDa), Ferritin (18,5 kDa und 220 kDa) sowie Thyreoglobulin (330 kDa).

2.4.3 Autoradiographie

Die Overlays wurden zwischen zwei Overheadfolien eingelegt und verklebt. Dann wurden sie auf einen Röntgenfilm (18cm x 24 cm, Fuji RX, NIF, Fa Fuji, Düsseldorf) gelegt und bei -80°C zwischen einem Tag und einer Woche lang belichtet. Nach der Exposition wurden die Filme unter Rotlicht im Röntgenentwickler bis zur gewünschten Bandenschwärzung entwickelt und schließlich im Fixierer (Entwickler und Fixierer Fa. Adefo, Nürnberg) eingelegt. Nach Waschen der Filme mit Aqua bidest wurden die Filme an der Luft getrocknet.

2.4.4 Overlay mit ¹²⁵I-BH-Calmodulin

Der Overlay erfolgte modifiziert nach der Methode von Berchtold (Fischer et al. 1996).

10-50 µg der zu untersuchenden Proben wurden in 50 µl Probenpuffer (s. 2.4.2) aufgelöst, dann drei Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von ca. 55 °C inkubiert und anschließend auf ein 10 % Polyacrylamid-SDS-Gel aufgetragen. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel 10 Minuten in Aqua bidest unter Schütteln gewaschen.

Die Pro-Blott-Membran (Fa. Amersham) wurde 10 Minuten in 100 % Methanol eingelegt. Mehrere Lagen Kartonpapier (Fa. Whatman) wurde in verschiedene Pufferbäder getränkt.

Es wurde folgende Puffer verwendet: Puffer 1 (20 % Methanol, 0,3 M Tris/HCl, pH: 10,4); Puffer 2 (20 % Methanol, 25 mM Tris/HCl, pH 10,4) und Puffer 3 (20 % Methanol, 25 mM Tris/HCl, pH 9,4).

Der Aufbau für den Blott-Vorgang sah folgendermaßen aus: auf der Anodenseite wurden drei Lagen Kartonpapier aus Puffer 1 gelegt, kathodenwärts dann 2 Lagen Papier aus Puffer 2, darüber die Pro-Blott-Membran, darauf das Acrylamid-SDS Gel, weiter kathodenwärts 2 Lagen Papier aus Puffer 3 und oberhalb dieser Papierlagen wurde die Kathode positioniert und der gesamte Aufbau mit 2,5 kg beschwert. Die Begrenzungen der Bahnen auf dem Acrylamid-SDS-Gel wurden auf der Blott Membran eingezeichnet. Schließlich wurde vier Stunden lang bei einer Spannung von ca. 7 V und einer Stromstärke von 40 mA geblottet.

Über Nacht wurde die Membran in Puffer 4 (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl) und am nächsten Tag 90 Minuten in Puffer 5 (10 mM Tris/HCL, 150 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mg/ml BSA, 0,1 % Tween 20) inkubiert.

Die Blott-Membran wurde entsprechend der Begrenzung der Bahnen in Streifen geschnitten und in 3 ml der Overlaylösung (10 mM Tris/HCL, 150 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mg/ml BSA, 0,1 % Tween 20, 1-10 µg/ml ¹²⁵I-BH-Calmodulin, 1Mio. cpm/µg) für vier Stunden eingelegt.

Es wurden jeweils Kontrollproben mitgeführt, bei denen im Puffer 5, in der Inkubationslösung und in der Waschlösung CaCl₂ gegen 20 mM EGTA ausgetauscht wurde.

Nach der Inkubation wurden die Streifen für viermal je 15 Minuten in Puffer 5 gewaschen. Schließlich wurde eine Autoradiographie durchgeführt.

2.4.5 Bestimmung der uCaM-Synthetase-Aktivität

Beruhend auf der Methode von Ziegenhagen und Jennissen (Ziegenhagen und Jennissen 1988) wurde dieser Test durchgeführt. Dem Inkubationsansatz (50 mM Tris/HCl, 1mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 0,5 mg/ml Calmodulin, 1mg/ml ¹²⁵I-CT-Ubiquitin, spezifische Radioaktivität 50-400 cpm/pmol) wurde die entsprechenden Enzymlösung zugesetzt (0,9 mg/ml für APFII, 0,3 mg/ml für Calmodulin-Sepharose-Eluat, 0,1 mg/ml für CaM-Seph-E-MonoQ und Gelfiltration). Weiterhin wurde jeweils spezifisch 1,1 mM CaCl₂ für die calciumhaltigen Ansätze bzw. 1mM EGTA für die calciumfreien Ansätze dazupipetiert. Die

Ansatzvolumina wurden durch Auffüllen mit Millipore auf 50 µl konstant gehalten. Nach 30 Minuten Inkubation der jeweiligen Ansätze wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Puffer 1 (20 mM Glycerophosphat, 1mM CaCl₂ pH=7,0) gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz sieben Minuten auf einem Heizblock auf 100 °C erhitzt und danach fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Die denaturierte Proteine wurden dann abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 13000 rpm, 5min), der Überstand in ein BSA-beschichtetes (Vorlage von 100 µl 30 mg/ml BSA im Eppendorfgefäß) 1,5 ml Eppendorf-Qualicup übergeführt und schließlich 0,2 ml (entspricht 0,1 ml packed Gel) Fluphenazin–Sepharose (Herstellung der Fluphenazin-Sepharose entsprechend der Methode von Jennissen und Botzet (Jennissen und Botzet 1993) zugefügt. Unter mehrmaligem Aufrühren wurde die Lösung fünf Minuten inkubiert und schließlich abzentrifugiert (drei Minuten, 13000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und dem Reaktionsgefäß 1 ml Puffer 2 (20 mM Glycerophosphat, 1 mM CaCl₂, 300 mM NaCl, pH 7,0) zugefügt. Entsprechend der beschriebenen Methode wurde zweimal gewaschen. Die Desorption der Konjugate erfolgte durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml Puffer 3 (20 mM Glycerophosphat, 500 mM NaCl, 10 mM EGTA pH 7,0).

Der Überstand (im folgendem EGTA-Eluat genannt) der Waschungen wurde gesammelt und mit dem γ-Counter (LS 7000 Liquid Scintillation System, Fa. Beckmann, München) standardmäßig eine Minute gemessen.

Die katalytische Aktivität der uCaM-Synthetase wurde auf der Grundlage der Gleichung 3 bestimmt:

$$\frac{(cpm_p - cpm_k) \times \text{Enzymverdünnung}}{cpm_{\text{spez. Ubiquitin}} \times \text{Inkubationszeit (sec)} \times \text{Ansatzvolumen (ml)}} = f_{\text{kat}} / \text{ml} \quad (\text{Gl. 3})$$

cpm_p = Radioaktivität des EGTA Eluats einer Probe (Ansatz in Gegenwart von Ca²⁺)

cpm_k = Radioaktivität des EGTA Eluats einer Kontrollprobe (Ansatz ohne Ca²⁺)

$cpm_{\text{spez. Ubi}}$ = spezifische Radioaktivität des [¹²⁵I] CT-Ubiquitins (cpm/pMol)

Die Bestimmung der calciumabhängigen Aktivität erfolgte durch Subtraktion der Calcium-freien Kontrollprobenansätze von den calciumhaltigen Proben. Zur Bestimmung der unspezifisch freigesetzten Radioaktivität dienten calciumhaltige Ansätze, die zusätzlich 10

mM EDTA enthielten (-ATP/Mg²⁺) bzw. Proben, die an Stelle der Enzymlösung Millipore enthielten.

Zur Bestimmung der Aktivität der uCaM SynF2 wurden sie mit 0,01 mg/ml uCaM SynF1 rekombiniert. Als Kontrollprobe dienten Inkubationsansätze, die allein die Untereinheit enthielten.

2.4.6 Leitfähigkeitsmessung

Zur Messung der KCl-Konzentration wurden zwei Methoden verwendet: einerseits wurde der zu untersuchenden Probe 20 µl entnommen, in 20 ml Aqua bidest aufgelöst und die Leitfähigkeit dieser Lösung mit dem Conductivity Meter (Stabelektrode CDC 364; Fa. Radiometer Copenhagen, Dänemark) gemessen. Andererseits wurde die Leitfähigkeit direkt mit Hilfe des Leitfähigkeitsmessgeräts des Äkta-Prime FPLC-Moduls (Fa. Amersham, Braunschweig) gemessen. Diese beiden Messungen wurden direkt verglichen. Die Ergebnisse korrelierten mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,999$ recht gut miteinander (Daten nicht dargestellt).

2.4.7 Datenauswertung

Bei den beschriebenen Statistiken wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichung und Variationskoeffizient bestimmt.

Die linearen und nicht-linearen Regressionsanalysen wurden mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism durchgeführt (GraphPad Software Inc., Version 5).

Die Tabellenkalkulation wurde mittels Excel 2000 (Fa. Microsoft.), die Auswertung der Acrylamid-SDS Gele und Calmodulin-Overlays mit Hilfe des Programmes Phoretix (Fa. Nonlinear Dynamics) durchgeführt.

2.4.8 Bioinformatrische Auswertungen

Die Röntgenstruktur- und NMR-Strukturdaten sind für einzelne Proteine in der jeweiligen Publikation enthalten. Eine Zusammenfassung der jeweiligen Ergebnisse und deren EDV-relevante Aufarbeitung ist in der Brookhaven-Datenbank abgespeichert. Ein möglicher Zugang zu dieser Datenbank erfolgt über diese Internetadresse: http://us.expasy.org/expasy_urls.html

Die durch Röntgenstrahlen erzeugten Beugungsbilder der Elektronenwolken der einzelnen Atome eines Moleküls werden jeweils in ein dreidimensionales kartesisches Molekülmodell umgerechnet. Ein limitierender Faktor ist die Tatsache, dass einige Atome im Kristall nicht starr an einer Position verharren sondern zwischen unterschiedlichen Koordinaten hin und her „springen“. Unter diesen Umständen können keine eindeutigen Beugungsbilder entstehen. Zusätzlich können durch Elektronenbeugungsbilder Wasserstoffatome nicht eindeutig identifiziert werden (alle Angaben zur Röntgenstrukturanalyse beruhen auf den Erläuterungen Rhodes 2000).

Das durch Röntgenstrukturanalyse gewonnene Modell kann durch weitere, zusätzlich gewonnene Informationen modifiziert werden.

Die Magnetresonanzmethode (NMR) misst den chemischen Shift der Atomkerne mit einem Spin ungleich Null. Dieser „Shift“ beruht auf der Protonendichte des jeweiligen Kerns und der umgebenden Atome. Die Ergebnisse, die dabei entstehen, geben eine Abschätzung über die Entfernung von spezifischen Atompaaren.

Da die Proteine in Wasser gelöst sind und somit ständig in Bewegung sind, stellen die Ergebnisse nicht ein eindeutiges Ergebnis sondern ein Mittelwert verschiedener Entfernungen der Atome dar. (Die obige Erklärung beruhen auf den Erläuterungen von Thompson 2002).

Das Programm "RasMol" dient zur EDV-vermittelten Visualisierung der Struktur der Proteine auf Basis der Röntgenstruktur- und NMR-Analyse. Dieses Programm ist auf der Internetseite: www.openrasmol.org frei erhältlich (Sayle und White 1995).

Ein weiteres Programm zur Visualisierung der 3-D-Struktur verschiedener Proteine ist "Protein Deep viewer", welches auf der Internetseite: www.expasy.org/spdbv/ erhältlich ist (Guex und Peitsch 1997).

Die Besonderheit des Programms besteht darin, dass es zusätzliche Programme enthält, mit denen die Struktur der Proteine weiter analysiert werden kann.

Ein solches Unterprogramm, "GROMOS", führt energetische Berechnungen der Stabilität eines Proteins auf dem Boden des Force-Field-Modells durch (Sippl, 1989). Das Programm GROMOS berechnet die Konformation eines Proteins, indem es die Summe der einwirkenden Kräfte (Summe der einwirkenden Torsions-, Bindungs-, Elektrostatik- und Bindungswinkelkräfte) addiert, diese mit der dreidimensional Lokalisation der einzelnen Aminosäure verknüpft und aus der Verknüpfung des Ortes und der einwirkenden Kräfte jeder Aminosäure eine potentielle Energie zuschreibt. Je größer die resultierende Energie ist, desto instabiler ist die Konformation des Proteins.

Ein weiterer Aspekt, der bei den bioinformatischen Untersuchungen im Vordergrund stand, war die Zugänglichkeit, welche vom Programm „Protein deep viewer“ berechnet wird. Je nach Lokalisation einer Aminosäure kann sie sich im „Innern“ eines Proteins oder an der Oberfläche des Eiweißes befinden. Des Weiteren kann die Zugänglichkeit durch benachbarte Aminosäuren begrenzt werden (z.B. durch deren Größe, Ladung oder räumliche Anordnung). Als Vergleichsgröße wird die Zugänglichkeit derselben Aminosäure in einem linearen Pentapeptid GGXGG hinzugezogen. Ein Wert von 1 für die Aminosäure X_1 bedeutet, dass die Zugänglichkeit für X_1 im Protein genauso groß ist, wie die von X_1 im Pentapeptid GGX₁GG.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung und Eigenschaften eines neuen Affinitätsgels für die Aufreinigung von Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase Faktor 2

3.1.1 Strukturelle Unterschiede zwischen gerichtet und ungerichtet immobilisiertem Calmodulin

Ein zentraler Punkt dieser Dissertation betrifft den Vergleich der affinitätschromatographischen Eigenschaften von gerichtet und ungerichtet immobilisiertem Calmodulin. Als ein Anwendungsbeispiel der gerichteten und ungerichteten Immobilisierung wurde die Aufreinigung von Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase Faktor 2 (uCaM Syn-F2) auf Calmodulin untersucht.

Bisher wurde uCaM Syn-F2 affinitätschromatographisch auf ungerichtet immobilisiertem Calmodulin aufgereinigt (Majetschak et al. 1998b). Calmodulin wurde dabei an Divinylsulfon (DVS) aktivierte Sepharose gebunden (s. Gl. 4 und 5, Sairam 1976).

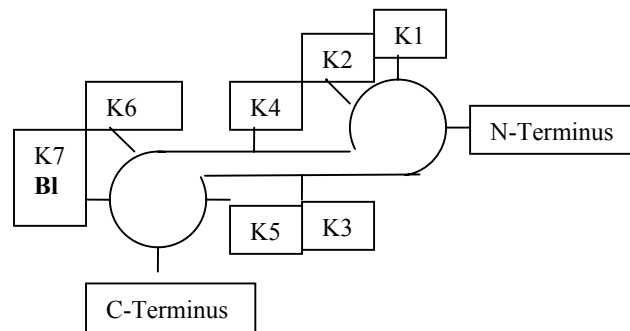


Hierbei wird zunächst die primäre Hydroxylgruppe der Sepharose (Seph-OH) durch DVS ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH-SO}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$) aktiviert (Gl. 4). Nach erfolgter Aktivierung der Sepharose wird Calmodulin ($\text{H}_2\text{N-R}$) an die aktivierte Sepharose ($\text{Seph-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$) gebunden (Gl.5). Eine schematische Darstellung der Struktur des Calmodulins ist in Abb. 4.1A wiedergegeben. Ungerichtet immobilisiertes Calmodulin wird über die Aminogruppe der Seitenkette des Lysins an die Sepharose gebunden (Abb. 4.1B). Calmodulin weist sieben verschiedene Lysine auf, das siebte Calmodulin ist aber blockiert und kann nicht an die Sepharose gebunden werden. Auf Grund der sechs verschiedenen Lysine bestehen somit auch sechs mögliche sterische Ausrichtungen. Einige dieser sechs möglichen sterischen Ausrichtungen könnten die Bindung der uCaM Syn-F2 behindern und somit die affinitätschromatographischen Ergebnisse negativ beeinflussen. Durch gerichtete Immobilisierung (z.B. durch Verwendung eines Fusionsproteins) werden alle Calmoduline zielgerichtet gleichartig immobilisiert, so dass Calmodulin bindende Proteine ohne sterische Hemmnisse gebunden werden können (Abb. 4.1C). Im Falle der gerichteten

Immobilisierung ist Calmodulin N-Terminal an das Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase (GST) gebunden (Abb.4.1C). Dieses Fusionsprotein (GST-Calmodulin) verdrängt kompetitiv Glutathion (Glu-SH, Abb. 4.1C) und bindet so an die Sepharose (Abb. 4.2). Der Grund für die Wahl des N-Terminus als Ort der Kopplung an GST war folgender: Das calmodulinbindende Enzym Phosphorylase Kinase bindet Calmodulin am C-Terminus (Jennissen und Botzet 1993). Der C-Terminus sollte freibleiben, da davon ausgegangen werden kann, dass sich auch uCaM Syn-F2 Calmodulin am C-Terminus bindet.

A)

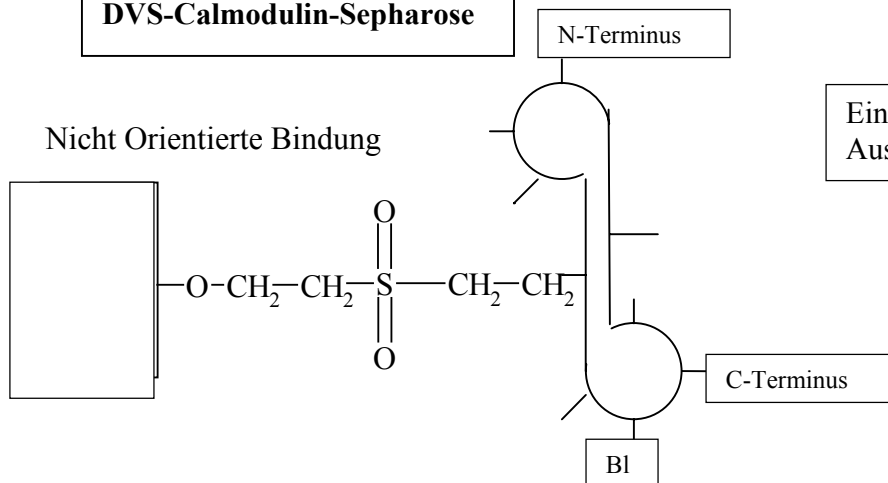
**Schemazeichnung
des Calmodulins**



Primäre ε-Aminogruppen des Lysins
am Calmodulin, K=Lysin, Bl=
Blockiert

B)

DVS-Calmodulin-Sephrose

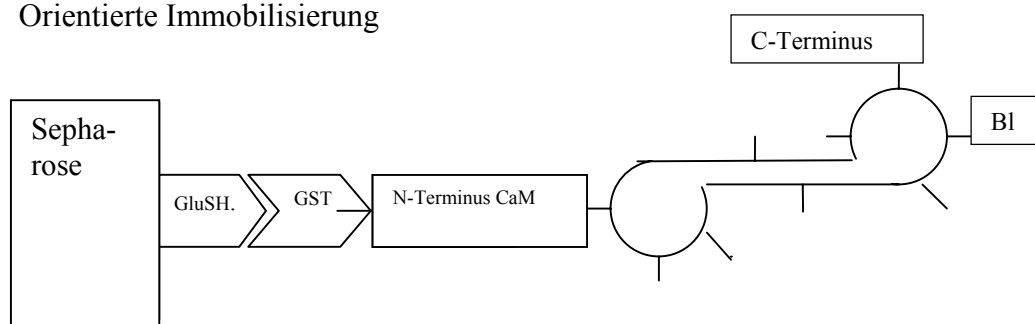


Eine von sechs möglichen
Ausrichtungen von Calmodulin

C)

GST-Calmodulin-Sephrose

Orientierte Immobilisierung



Alle Moleküle mit einer Ausrichtung
gebunden

Abb. 4.1 : Orientierte und nicht orientierte Immobilisierung des Calmodulins am Beispiel der DVS-Calmodulin-Sephrose und der GST-Calmodulin-Sephrose

A: Dargestellt ist die schematische Struktur des Calmodulins (bezüglich der 3-D-Struktur sei auf Abb. 2 in der Einleitung verwiesen) mit den sieben Lysinseitenketten. Die siebte Lysinseitenkette ist trimethyliert (blockiert= Bl) und kann aus diesem Grund nicht an die Sepharose gekoppelt werden. Hierbei stellen K1 bis K7 die Position des jeweiligen Lysins

dar, wobei K1 für das Lysin an Position 13, K2 für Lys 21, K3 für Lys 30, K4 für Lys 75, K5 für Lys 77, K6 für Lys 94 und K7 für Lys 115 steht. Die Positionsangabe bezieht sich auf die Position der Aminosäure vom N-Terminus aus betrachtet. Die Seitenketten des Lysins sind in der Schemazeichnung mit „_____“ symbolisch dargestellt.

B: Schematisch wird eine von sechs möglichen Ausrichtungen des Calmodulins im Falle der DVS-Calmodulin-Sepharose wiedergegeben.

Calmodulin ist über die Aminogruppe der Lysinseitenkette an die Sulfongruppe des Divinylsulfons gebunden.

C: Im Falle des Glutathion-S-Transferase-Calmodulins (GST-Calmodulins) ist Calmodulin N-terminal an die Glutathion-S-Transferase-Gruppe (GST-Gruppe) gebunden und dieser verdrängt kompetitiv Glutathion (Glu-SH, siehe hierzu auch 4.2).

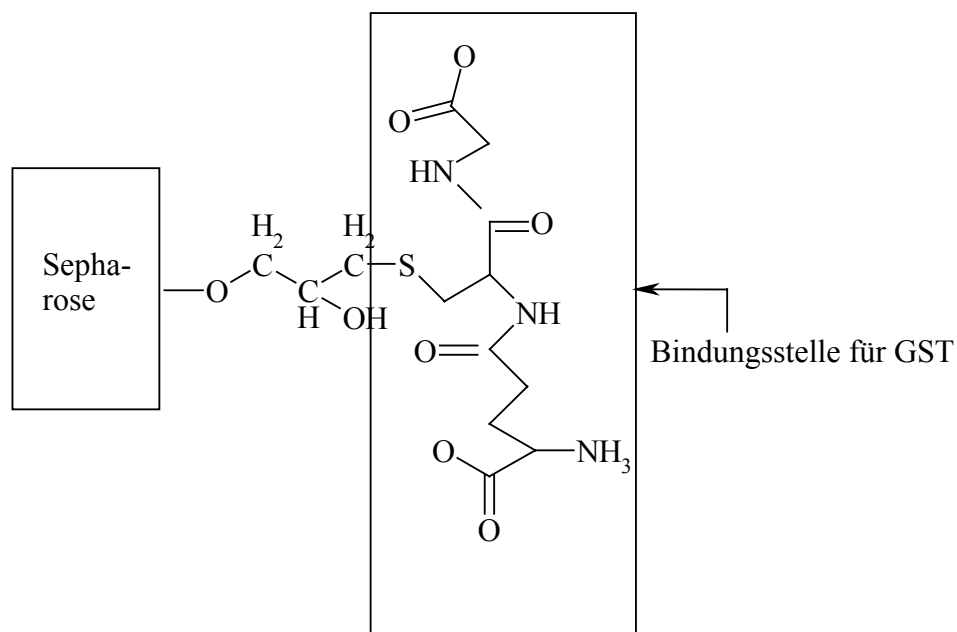


Abb. 4.2: Struktur von Glutathion-Sepharose und Bindungsstelle für Glutathion-S-Transferase (GST)

Darstellung der Bindungsstelle des GST-Calmodulins an der Glutathion-Sepharose. GST-Calmodulin verdrängt kompetitiv Glutathion und bindet an die Sepharose.

3.1.2 Isolierung von Glutathion-S-Transferase-Calmodulin (GST-Calmodulin)

Glutathion-S-Transferase-Calmodulin wurde auf molekularbiologischem Wege hergestellt. Bezüglich der genauen Vorgehensweise sei auf 2.2.9 verwiesen. Nach Gewinnung des Ultrazentrifugenüberstandes des Rohlysats wurde dieser für die weiteren Untersuchungen verwendet. Im weiteren wird dieser Ultrazentrifugenüberstand mit „GST-Calmodulin-Rohlysats“ bezeichnet. Eine gelelektrophoretische Auftrennung des Überstandes des GST-Calmodulin-Rohlysats in Gegenwart von SDS wird in Abbildung 5 dargestellt.

Der Anteil des GST-Calmodulins an der Gesamtproteinmenge des GST-Calmodulin-Rohlysats (Bahn 3 Abb. 5) betrug ca. 30 %, die molekulare Masse des GST-Calmodulins wurde mit 41 kDa berechnet. Diese Auswertung erfolgt mit Hilfe des Elektrophoreseauswertungsprogramms Phoretix. Dieses Programm ist in der Lage aus dem Schwärzungsgrad der Bande den relativen Anteil des gewünschten Proteins an der Gesamtproteinfraktion zu berechnen und nach Eingabe der entsprechenden Standards auch die molekulare Masse dieser Bande zu berechnen.

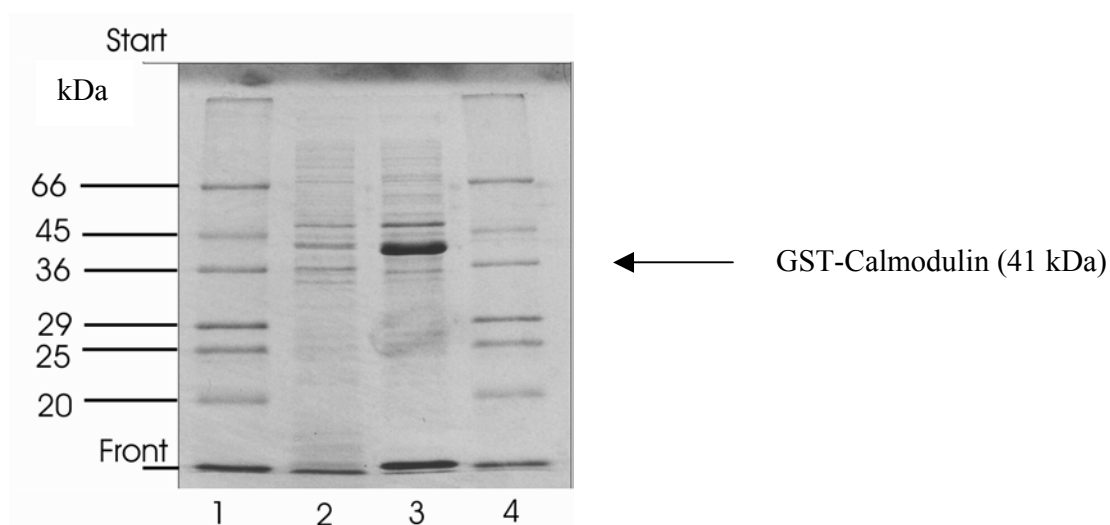


Abb. 5: Analyse des Ultrazentrifugenüberstandes der GST-Calmodulin-Rohlysats mit Hilfe der Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese:

Die einzelnen Fraktionen der GST-Calmodulin-Präparation wurden auf ein 15 % Polyacrylamid-SDS-Gel aufgetragen. Dargestellt sind von links nach rechts:

Bahn 1: 10 µl der Proteinstandards (bestehend aus BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glycerin-aldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29,2 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Lactalbumin (14,2 kDa),

Bahn 2: Bakterienpool vor der Induktion

Bahn 3: GST-Calmodulin-Rohlysate

Bahn 4: Standards wie in Bahn 1.

Bereits vor der Induktion wird GST-Calmodulin in einem geringen Maße synthetisiert. Die Auswertung des Polyacrylamid-SDS-Gels mit Hilfe des Programmes Phoretix erbrachte eine molekulare Masse von 41 kDa für GST-Calmodulin. Der Proteinanteil des GST-Calmodulins an der Gesamtproteinmenge wurde mit 30 % veranschlagt.

3.1.3 Bestimmung der Kapazität von Glutathion-Sepharose für GST-Calmodulin

Um einen ersten Anhalt über die Kapazität der Glutathion-Sepharose für GST-Calmodulin zu erhalten, wurden in einem Versuchsansatz 21 mg GST-Calmodulin-Rohlysate (s. Tab. 1) auf die Glutathion-Sepharose aufgetragen; der Anteil des GST-Calmodulins an der

Gesamtproteinfraktion des Rohlysatzgemisches betrug 40 % (entsprechende Abbildung nicht dargestellt), dies entsprach somit einer aufgetragenen GST-Calmodulinmenge von 8,4 mg. Das Chromatogramm dieses Versuchsansatzes ist in Abb. 6 wiedergegeben. Der Vorgang der Bindung des GST-Calmodulins an Glutathion-Sepharose ist insoweit reversibel, als dass durch Auftrag von Glutathion GST-Calmodulin kompetitiv von der Sepharose eluiert werden kann.

Diese Tatsache ist ein indirekter Nachweis der orientierten Immobilisierung. Nur gerichtet an die Glutathion-Sepharose gebundenes Calmodulin kann durch Glutathion affinitätschromatographisch kompetitiv heruntergewaschen werden. Nach Waschen des Gels mit dem Auftragspuffer wurden 8 ml 10 mM Glutathion auf das Gel aufgebracht und so 5,8 mg Gesamtproteinmenge eluiert (s. Tab. 1). Eine gelelektrophoretische Auftrennung dieser Fraktion (Abb. 7) ergab einen GST-Calmodulinanteil von 80 % (Auswertung mittels des Phoretix-Programmes). Somit wurden von der Säule 4,6 mg (80 % von 5,8 mg Gesamtprotein) reines GST-Calmodulin gebunden. Diese Menge entsprach 55 % der aufgetragenen GST-Calmodulinmenge (4,6 mg gebundenes GST-Calmodulin von insgesamt 8,4 mg aufgetragenem GST-Calmodulin-Rohlysatz). Von dieser orientierten Immobilisierung konnte eine unspezifisch gebundene Proteinfraktion abgegrenzt werden. Diese unspezifisch und nicht orientiert gebundene 1,4 mg Proteinmenge wurde durch 6 ml 1 % SDS von der Säule heruntergewaschen (Tab. 1).

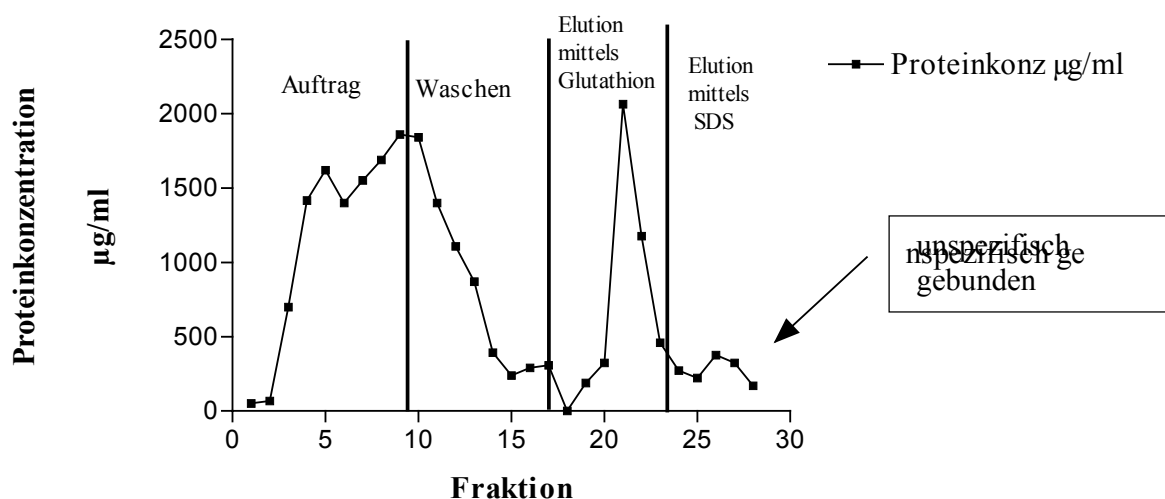


Abb. 6: Affinitätschromatographieaufreinigung von GST-Calmodulin auf der Glutathion-Sepharose:

Es wurden 21 mg GST-Calmodulin-Rohlysatz (Volumen des Auftrages 9,8 ml, Proteinkonzentration 2,1 mg/ml), wie unter 2.2.9 beschrieben, auf die Glutathion-Sepharose (1,1 ml

packed Gel) aufgetragen. So dann wurden nacheinander 8 ml 10 mM Glutathion und 6 ml 1% SDS aufgetragen (s. 2.2.9). Glutathion verdrängt kompetitiv GST-Calmodulin von der Glutathion-Sepharose. Die unspezifisch an die Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine wurden durch 1 % SDS eluiert.

Die Proteinausbeute über 100 % ist auf Meßungenauigkeiten der Proteinkonzentrationsbestimmung durch die Lowry-Methode zurückzuführen

Tab. 1: **Reinigungstabelle zur Bindung des GST-Calmodulins an die Glutathion-Sepharose (Abb. 6)**

Probe	Volumen ml	Gesamtproteinmenge mg	Proteinausbeute (in Relation zum Auftrag) %
Auftrag	9,8	21	100
Durchlauf	17	16,7	80,5
Elution durch 10 mM Glutathion	8,2	5,8	26,6
Elution durch 1 % SDS	6	1,4	6,7

Dargestellt sind die einzelnen Fraktionen des Auftrages des GST-Calmodulin-Rohlysats auf die Glutathion-Sepharose sowie die anschließende affinitätschromatographische Elution der gebundenen GST-Calmodulinmenge durch Glutathion. Aufgetragen wurde 9,8 ml des GST-Calmodulin-Rohlysatzgemisches (gemäß 2.2.8) auf eine Säule mit 1,1 ml *packed Gel* Glutathion-Sepharose. Durch Auftrag von 8 ml 10 mM Glutathion und nachfolgend 6 ml 1 % SDS wurden die oben beschriebenen Proteinfraktionen eluiert. Von der Bilanz her fanden sich 16 mg (75 %) der aufgetragenen Proteinmenge im Durchlauf wieder. Von der eluierbaren Proteinmenge wurden 5,8 mg mittels Glutathion spezifisch eluiert. Die restliche, nicht orientiert und unspezifisch gebundene 1,4 mg Proteinfraktion wurde durch 1 % SDS eluiert.

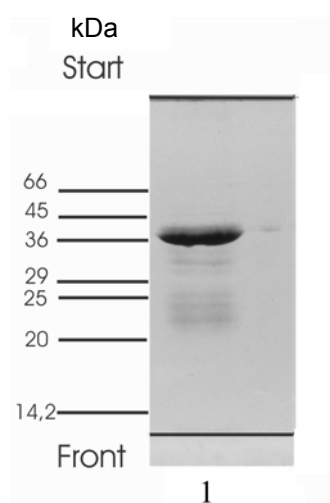


Abb. 7: **Acrylamid-SDS-Gel des eluierten Fusionsproteins:**

Dargestellt sind auf ein 15% Acrylamid-SDS-Gel:

Bahn 1: 5 µg Glutathion-Eluat. Die Glutathion-Sepharose wurde durch Auftrag von 21 mg GST-Calmodulin-Rohlysats gemäß 2.2.9 beladen. So dann wurde die gebundene GST-Calmodulinmenge durch Auftrag von 10 mM Glutathion bestimmt.

Die Auswertung des SDS-Gels erbrachte einen Wert von 41 kDa für GST-Calmodulin. Weitere Analysen ergaben, dass GST-Calmodulin ca. 80 % der eluierten Proteinmenge ausmacht. Dies ist ein weiterer Beleg für die spezifische Elution mittels Glutathion und somit für den Charakter der gerichteten Immobilisierung.

Zur Verifikation der Kapazität wurden in dreizehn Läufen Glutathion-Sepharose mit GST-Calmodulin beladen (s. Tabelle 2). Dabei wurde das Gel mehrmals mit GST-Calmodulin beladen und das gebundene GST-Calmodulin wieder von der Säule eluiert. Die Bindungskapazität der Glutathion-Sepharose für GST-Calmodulin veränderte sich auch im Verlauf mehrerer Beladungszyklen nicht (Tab. 2). Somit kann die Glutathion-Sepharose mehrmals verwendet werden. Die durchschnittliche Beladungskapazität für GST-Calmodulin betrug 5,2 mg/ml packed Gel bei einer Standardabweichung von 0,9 mg/ml packed Gel.

Tab. 2: Immobilisierte GST-Calmodulinmenge mehrerer Präparationen

Präparation	Kapazität der Glutathion-Sepharose für GST-Calmodulin im mg/ml packed Gel
1	6,0
2	7,2
3	5,6
4	5,2
5	4,4
6	5,6
7	4,5
8	3,7
9	3,9
10	6,4
11	5,0
12	5,3
13	5,2
Mittelwert	5,2
Standardabweichung	0,97

Glutathion-Sepharose wurde mit je 8 mg/ml packed Gel reinem GST-Calmodulin beladen. Die Parameter der Säule lauteten: 25 ml Gelvolumen, Innendurchmesser: 5 cm, Gelhöhe: 4,8 cm. Nach jeder Beladung wurde entsprechend der oben beschriebenen Methode (s. 2.2.9) die gebundene GST-Calmodulinmenge bestimmt. Die durchschnittliche, gebundene GST-Calmodulinkonzentration betrug 5,2 mg/ml. Die molekulare Masse des GST-Calmodulins beträgt 41 kDa, die des GST 22 kDa und die des Calmodulins 19 kDa. Somit

entsprechen 5,2 mg/ml packed Gel gebundenes GST-Calmodulin einer gebundenen Calmodulinmenge von 2,6 mg/ml packed Gel.

3.1.4 Affinitätschromatographie von Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase Faktor 2 auf GST-Calmodulin-Sephrose

Nach Bestimmung der Bindungskapazität von Glutathion-Sephrose für GST-Calmodulin wurden die affinitätschromatographischen Eigenschaften dieses Gels hinsichtlich der Bindung von uCaM Syn-F2 untersucht.

Als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie von uCaM Syn-F2 auf GST-Calmodulin diente der Durchlauf von APFII auf Ubiquitin-Sephrose (im folgenden U-Seph-D genannt).

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von uCaM Syn-F2 auf GST-Calmodulin-Sephrose (dieser Aufreinigungsschritt wird mit Calmodulin-Sephrose-Eluat Präparation bezeichnet; abgekürzt CaM-Seph-E Präparation) erfolgte gemäß 2.3.2.1. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abb. 8 wiedergegeben.

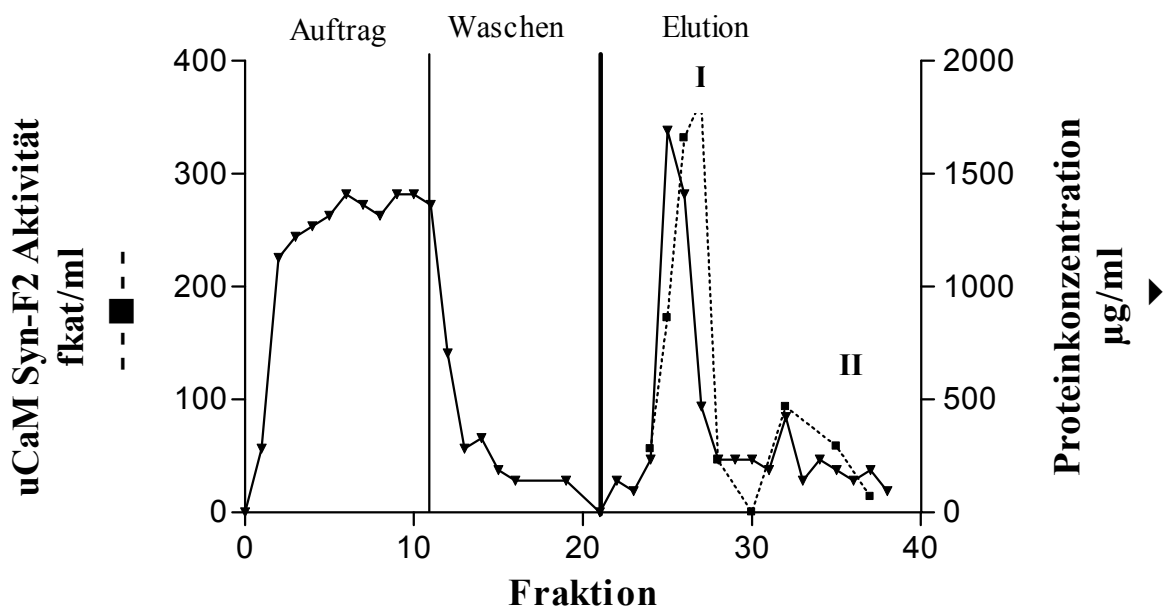


Abb. 8: Affinitätschromatographie von uCaM Syn-F 2 (U-Seph-D) auf GST-Calmodulin-Sephrose.

Durch Auftrag von 520 mg des GST-Calmodulin-Rohlysats (Volumen 400 ml, Proteinkonzentration 1,3 mg/ml) wurde die Glutathion-Sephrose mit GST-Calmodulin (gemäß 2.2.9) beladen. Die Maße der Säule lauteten: 25 ml Gelvolumen, Innendurchmesser: 5 cm, Gelhöhe: 4,8 cm. Nach Abschluss der Beladung des Gels wurde eine

CaM-Seph-E Präparation durchgeführt. Aufgetragen wurden 60 ml des Durchlaufes von APFII auf der Ubiquitin-Sepharose (Aktivität 290 fkat/ml, 690 fkat/mg, Gesamtaktivität: 34800 fkat). Nach Beendigung des Auftrages wurde mit 140 ml des Auftragspuffers nachgewaschen. Anschließend wurde mit EGTA eluiert. Die Bindung von uCaM Syn-F2 an Calmodulin ist Calcium abhängig, nach Entzug des Calciums aus dem Säulepuffer durch Zugabe von EGTA bindet Calmodulin die uCaM Syn-F2 nicht mehr. Die Elution wies zwei Aktivitätspeaks auf (I und II). Der erste Peak reichte von Fraktion 21 bis 30. Innerhalb dieses Peaks wurden 22 000 fkat eluiert. Die übrige Aktivität wurde zwischen Fraktion 31 und 38 eluiert. Die in diesem Versuch dargestellten Aktivitätsergebnisse stellen die Differenz zwischen der Calcium abhängigen und der Calcium-unabhängigen Aktivität dar (s. 2.4.5, spez. Radioaktivität ^{125}I -CT-Ubiquitin: 100 cpm/pMol, eingesetztes Enzymvolumen: 5 μl). Fraktionsgröße: Fraktion 1-16: 10 ml, Fraktion 16-23: 13 ml, Fraktion 21-38: 5 ml. Die Chromatographie erfolgte gemäß 2.3.2.1.

Nach Abschluss des Auftrages des U-Seph-Ds und anschließendem Nachwaschen wurde uCaM Syn-F2 durch Zugabe des Chelatbildners EGTA (EGTA bindet Calcium, die Bindung von uCaM-SynF2 an Calmodulin ist calciumabhängig) eluiert. Von der eingesetzten Aktivität (34800 fkat) fanden sich 24800 fkat und somit 70% der eingesetzten Aktivität im Eluat wieder (Tab. 3). Die Elution wies zwei Aktivitätspeaks auf (I und II Abb. 8). Der erste Peak reichte von Fraktion 21 bis 30. Innerhalb dieses Peaks wurden 22 000 fkat eluiert. Die übrige Aktivität wurde zwischen Fraktion 31 und 38 eluiert.

UCaM Syn-F2 wurde im Vergleich zum Auftrag im Eluat 9-fach angereichert (Tab. 3).

Tab 3: Reinigungstabelle für Aufreinigung der uCaM Syn-F2 auf GST-Calmodulin-Sepharose

	Volumen ml	Aktivität					Protein
		Aktivität fkat/ml	spez. Aktivität fkat/mg	Gesamt- aktivität fkat	Ausbeute %	Anreicherung	Gesamtprotein- menge
Auftrag	120	290	619	34800	100		56.3
Durchlauf	260	10	69	2600	7	0.1	39
Elution (Fraktion 24-29)	30	830	5500	24800	70	8.9	4.5

Die Reinigungstabelle bezieht sich auf die in Abb. 8 durchgeführten Affinitätschromatographie. Wie aus der Tabelle ersichtlich, wird 70 % der Aktivität im Bereich der Fraktionen 24-29 eluiert, wohingegen 75 % der Proteinmenge im Durchlauf erscheinen. Dies spiegelt die gute Aufreinigung (neunfache Aufreinigung) dieser Affinitätschromatographie wieder.

Die elektrophoretische Auftrennung der Eluate in der SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese ergab mehrere Banden (s. Abb. 9). Diese Affinitätschromatographie erbrachte zwar eine gute Aufreinigung, jedoch war bei 10-facher Anreicherung noch keine Reindarstellung des

Enzymkomplexes zu erwarten. Eine einzelne Bande, die uCaM-SynF2 oder zumindest einer Untereinheit dieses Proteins zuzuordnen wäre, ließ sich nicht eindeutig ausmachen. Jedoch stachen folgende Banden hervor: eine Bande mit einer molekularen Masse zwischen 36 kDa und 45 kDa (diese Bande könnte auch GST-Calmodulin darstellen, siehe 3.1.5), eine Bande mit einer molekularen Masse von ca. 96 kDa sowie zwei Banden oberhalb einer molekularen Masse von 138 kDa.

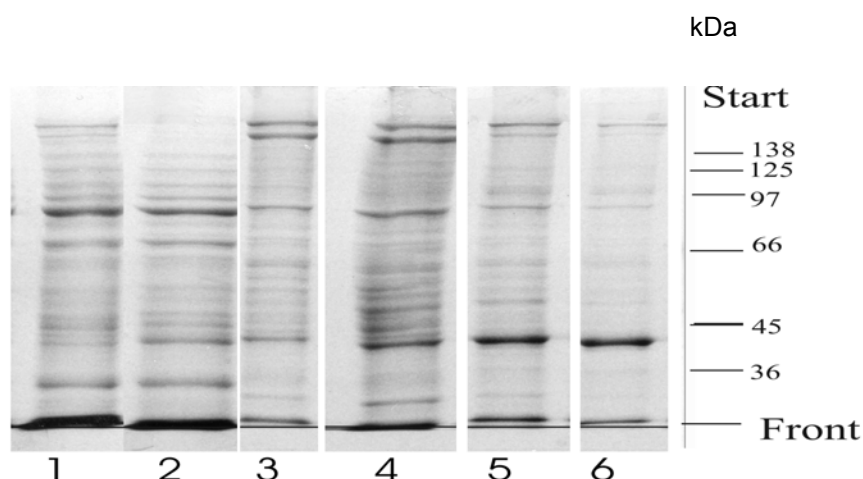


Abb. 9: Acrylamid-SDS-Gel elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen einer uCaM Syn-F2 (aus U-Seph-D) Anreicherung auf GST-Calmodulin-Sepharose

Auf 10% Polyacrylamid-SDS Gel wurden aufgetragen:

Bahn 1: 36 µg des Auftrages von U-Seph-D auf GST-Calmodulin;

Bahn 2: 50 µg Pool des Durchlaufes des Auftrages der CaM-Seph-E Präparation.

Bahn 3: 20 µg der Fraktion 22 der EGTA-Elution der CaM-Seph-E Präparation.

Bahn 4: 45 µg der Fraktion 23 der EGTA-Elution der CaM-Seph-E Präparation.

Bahn 5: 25 µg der Fraktion 24 der EGTA- Elution der CaM-Seph-E Präparation..

Bahn 6: 10 µg der Fraktion 25 der EGTA-Elution der CaM-Seph-E Präparation..

Hervorzuheben sind folgende Banden: eine Bande zwischen 36 und 45 kDa, die GST-Calmodulin entsprechen könnte (s. 3.1.5); sowie eine Bande mit einer molekularen Masse im Bereich von 97 kDa sowie zwei Banden mit einer molekularen Masse von über 138 kDa.

3.1.5 Bindungsstabilität von GST-Calmodulin-Sepharose

In den folgenden Versuchen wurde die Wiederverwendbarkeit der GST-Calmodulin-Sepharose für mehrere CaM-Seph-E Präparationen untersucht. Nach Beladung der Glutathion-Sepharose mit GST-Calmodulin (analog 2.2.9) wurden auf die GST-Calmodulin-Sepharose 0,5 M und 1 M NaCl aufgetragen um zu sehen, ob GST-Calmodulin verloren geht. Anschließend wurde die gebundene GST-Calmodulinmenge durch Zugabe von 10 mM Glutathion bestimmt (Tab. 4).

Durch die oben beschriebenen Waschungsschritte (0,5 M NaCl und 1 M NaCl) wurden nur jeweils 2 % (90 µg bzw. 150 µg von 6540 µg) der gebundenen GST-Calmodulinmenge heruntergewaschen, also fand kein nennenswerter Verlust statt. Nach Durchführung einer CaM-Seph-E Präparation auf GST-Calmodulin-Sepharose (s. 2.3.2.1) wurde von dieser Säule erneut ein 1 ml Aliquot Gel entnommen.

Die abermals durchgeführten Waschungsschritte auf diesem Aliquotgel mit Neutralsalzen erbrachten ähnliche Ergebnisse wie die Waschungsschritte vor Durchführung der Präparation (s. Tab. 4). Jedoch war eine Abnahme der immobilisierten GST-Calmodulinmenge um 20 % (von 6540 µg auf 5010 µg) zu verzeichnen (Tab. 4).

Tab. 4: **Bindungsstabilität der GST-Calmodulin-Sepharose**

	Eluierte GST-Calmodulinmenge in µg/ml packed Gel				Beladung mit GST-Calmo- dulin µg/ml packed Gel
Schritt	Auftrags- puffer PBS	0,5 M NaCl	1 M NaCl	10 mM Glutathion	
Kontrolle	0	90	150	6300	6540
Nach einem Affinitätslauf	0	90	120	4800	5010

Nach Beladen der Glutathion-Sepharose (Hauptsäule genannt, die Parameter der Säule lauteten: 25 ml Gelvolumen, Innendurchmesser: 5 cm, Gelhöhe: 4,8 cm.) mit GST-Calmodulin gemäß 2.2.9 wurde dieser Säule 1 ml Aliquot GST-Calmodulin-Sepharose entnommen. Dann wurden jeweils 10 ml 0,5 M NaCl und 10 ml 1 M NaCl auf das Aliquot-Gel aufgetragen. Mittels dieser Waschungsschritte konnte keine wesentliche Elution der gebundenen GST-Calmodulinmenge erreicht werden.

Um die Beladungsmenge der immobilisierten GST-Calmodulin zu bestimmen, wurde im Weiteren 10 ml 10 mM Glutathion auf die Sepharose aufgetragen.

Anschließend wurde mit der Hauptsäule eine CaM-Seph-E-Präparation auf GST-Calmodulin-Sepharose (s.2.3.2.1) durchgeführt. Nach Abschluss der Präparation wurde wiederum ein Aliquot von 1 ml entnommen. Auf dieses 1 ml Aliquot-Gel wurden erneut 10 ml 0,5 M NaCl und 10 ml 1M NaCl aufgetragen. Auch hierbei konnte durch die Neutralsalz-Waschungsschritte nur ca. 3 % (90 µg bzw. 120 µg von 5010 µg) der gebundenen GST-Calmodulinmenge eluiert werden. Jedoch war eine Abnahme der gebundenen Calmodulinmenge um 20 % festzustellen (von 6,5 mg auf 5 mg).

Die GST-Calmodulin-Sepharose wurde in einem weiteren Ansatz für mehrere Affinitätschromatographiezyklen verwendet. Nach jeder CaM-Seph-E Präparation wurde durch Aliquotentnahme die gebundene GST-Calmodulinmenge (s. 2.2.9) bestimmt, die Ergebnisse dieser Reihe sind in Tab. 5 dargestellt.

Im Verlauf von drei Präparationszyklen war eine Abnahme der immobilisierten GST-Calmodulinmenge um ca. 80 % zu verzeichnen (Tab. 5). Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass GST-Calmodulin mit dem affinitätsgebundenem Protein eluiert wurde. Ein weiterer Hinweis dafür ist auch die in Abb. 9 auftretende Bande zwischen 36 und 45 kDa, die GST-Calmodulin entsprechen könnte.

Schlussfolgernd kann die GST-Calmodulin-Sepharose nur für einen, maximal zwei Zyklen CaM-Seph-E Präparation benutzt werden.

Auf Grund der obigen Ergebnisse wurde bei den folgenden präparativen Chromatographien die Glutathion-Sepharose vor einem neuen präparativen Schritt erneut mit GST-Calmodulin beladen.

Tab. 5: GST-Calmodulin Gehalt der Glutathion-Sepharose im Verlauf mehrerer Präparationen

Präparationszyklen	Immobilisierte GST-Calmodulinmenge in mg/ml packed Gel
0	3,7
1	2,5
3	0,5
Wiederbeladung	4,1

Die immobilisierte GST-Calmodulinmenge der Glutathion-Sepharose vor und nach Abschluss mehrerer CaM-Seph-E Präparationen bestimmt. Die Parameter der Säule lauteten: 25 ml Gelvolumen, Innendurchmesser: 5 cm, Gelhöhe: 4,8 cm. Die Ausgangskonzentration des immobilisierten GST-Calmodulins betrug 3,7 mg/ml packed Gel. Nach jedem Affinitätschromatographielauf wurde die noch gebundene GST-Calmodulinmenge bestimmt (analog 2.2.9). Zu beachten ist, dass bei der dritten Präparation die gebundene GST-Calmodulinmenge erst nach dem Lauf bestimmt wurde. Im Verlauf eines Affinitätschromatographielaufes war eine Abnahme der gebundenen GST-Calmodulinmenge um 20-40 % (z.B. von 3,7 mg/ml auf 2,5 mg/ml packed gel) zu verzeichnen. Wurde die Säule erneut mit GST-Calmodulin beladen, so erreichte die immobilisierte GST-Calmodulinmenge den ursprünglichen Wert.

3.1.6 Bestimmung der Bindungskapazität von GST-Calmodulin-Sepharose für uCaM Syn-F2

Nach Abschluss der Versuchsreihen zur Charakterisierung der Eigenschaften des gerichtet immobilisierten GST-Calmodulins (s. 3.1.4) wurden eine Reihe von affinitätschromatographischen Aufreinigungen von uCaM Syn-F2 auf GST-Calmodulin-Sepharose durchgeführt.

Es wurden zunächst in Vorversuchen als Proben Pools untersucht, die jeweils unterschiedlich lange Zeit (zwei Monate, fünf und sechs Jahre) und unter unterschiedlichen Bedingungen (in Anwesenheit und in Abwesenheit von Calcium) bei -80 °C gelagert wurden. Eine Zusammenfassung dieser Präparationsreihe ist in Tab. 6 dargestellt.

Wie aus der Tabelle 6 ersichtlich, wurden Aktivitätsmengen von 21 000 fkat bis hin zu 117040 fkat eingesetzt, die immobilisierte GST-Calmodulinmenge variierte in einem Bereich zwischen 3,7 mg/ml und 6,4 mg/ml packed Gel, die erzielte Anreicherung schwankte zwischen 4- und 7-fach. Diese Daten sind in Abb. 10 zusammengefasst.

Hierzu wurde die von der Säule gebundene Aktivität (und anschließend eluierte Aktivität) in Relation zur aufgetragenen Aktivität gesetzt. Dabei wurde folgende Normierung benutzt: Aufgetragene Aktivität/(immobilisierte GST-Calmodulinmenge) sowie eluierte Aktivität/(GST-Calmodulinmenge) (s. Abb. 9). Die Daten ließen sich an eine Hyperbel (nicht lineare Anpassung) anpassen. Der hohe Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,94$ kann als ein möglicher Beleg für die Richtigkeit der Wahl dieses Modells (Abb. 10) gelten. Mit zunehmender aufgetragener Aktivität nimmt die gebundene und damit eluierbare Aktivitätsmenge zu. Weiterhin ist aus der Abb. 10 ersichtlich, dass eine Sättigung noch nicht erreicht wurde. Die „apparente“ (da noch nicht feststeht, ob es sich hierbei um eine echte Bindungskapazität im Gleichgewicht handelt) Halbsättigungskonstante ($K'_{0,5}$) betrug 580 fkat/mg immobilisierte Calmodulinmenge und die scheinbare maximale eluierbare Aktivitätsmenge 960 fkat/mg immobilisierte Calmodulinmenge.

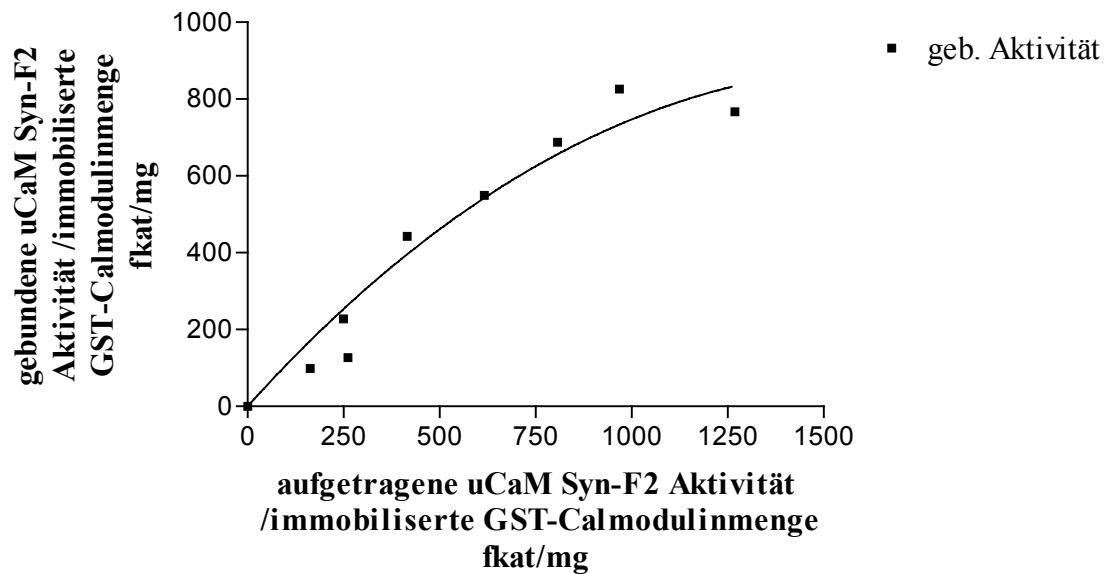


Abb. 10: **Bindungskapazität der GST-Calmodulin-Sepharose bezüglich uCaM Syn-F2:**

Dargestellt sind hierbei die aufgetragene Aktivität und die gebundene Aktivität (in Relation zur immobilisierten Calmodulinmenge). Die obigen Ergebnisse beruhen auf den in Tab 6. dargestellten Resultaten. Die „apparente“ Halbsättigungskonstante ($K'_{0,5}$) betrug 580 fkat/mg immobilisierte Calmodulinmenge und die scheinbar maximale eluierbare Aktivitätsmenge 960 fkat/mg. Als Modell für die nicht-lineare-Anpassung der Kurve wurde eine Hyperbel benutzt. Der Korrelationskoeffizient betrug $r^2 = 0,94$. Mit zunehmender aufgetragener Aktivität nimmt die gebundene Aktivitätsmenge zu. Ein Maximum ist in dieser Versuchsreihe noch nicht erreicht worden.

Tab. 6 : Zusammenfassung der Reinigungsfraktionen und Ausbeuten von neun Affinitätschromatographien von U-Seph-D Fraktion auf orientiert immobilisiertem Calmodulin

Präparation	Auftragsvolumen ml	Gesamt aufgetragene Aktivität fkat	Gesamteluierte Aktivität fkat	Spez. Aktivität im Eluat fkat/mg	Ausbeute %	Anreicherung	Protein		Immobilisierte GST-Calmodulinmenge mg/ml packed Gel	Lagerung des Ausgangsmaterials
							Aufgetragene Proteinmenge mg	eluierte Proteinmenge mg		
1	120	34800	31800	26500	91	6	56,3	6,6	5,6	+ Ca
2	96	25540	30000	7000	100	11	31	4,4	4,5	+Ca
3	95	117040	70750	13940	60	5	38	4,4	3,7	+ Ca
4	100	60100	53610	11890	89	10	50	4,4	3,9	-Ca
5	110	66110	70410	11430	100	10	50,4	4,4	6,4	-Ca
6	100	60000	59000	17000	100	10	60	3,4	n.b.	-Ca
7	90	57000	28000	6190	50	4	36	4,8	5	-Ca
8	90	34650	17000	3900	49	5	36	4,3	5,3	-Ca
9	90	21150	12880	3830	60	7	36	3,4	5,2	-Ca

Dargestellt sind die Ergebnisse der Aufreinigung der uCaM Syn-F2 auf GST-Calmodulin gemäß 2.2.9. Das Säulenvolumen betrug 25 ml Innendurchmesser: 5 cm, Gelhöhe: 4,8 cm. Einige U-Seph-D wurden in Gegenwart von Calcium eingefroren. Wie noch zu zeigen, beeinflusst dies die Ergebnisse der weiteren Chromatographien. Die molekulare Masse des GST-Calmodulins beträgt 41 kDa, die des GST 22 kDa und das des Calmodulins 19 kDa. Dies bedeutet, dass die gebundene Calmodulinmenge der Hälfte der angegebenen immobilisierten GST-Calmodulinmenge entspricht. n.b.: nicht bestimm

3.1.7 Vergleich der Affinitätschromatographien auf gerichtet und nicht gerichtet-immobilisiertem Calmodulin

Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie von uCaM Syn-F2 auf GST-Calmodulin-Sepharose wurden mit denen der Affinitätschromatographie auf DVS-Calmodulin-Sepharose verglichen (Tab. 7). Auf GST-Calmodulin-Sepharose konnte uCaM Syn-F2 ca. 7,5-fach angereichert werden und wies nach der Anreicherung eine spezifische Aktivität von 11 pkat/mg auf, vice versa konnte auf DVS-Calmodulin-Sepharose eine Anreicherung von 10,7-fach und eine spezifische Aktivität von uCaM Syn-F2 von 10 pkat/mg erzielt werden.

Hinsichtlich der beiden Merkmale "Anreicherung" und "erzielte spezifische Aktivität" unterschieden sich beide Orientierungsmethoden nicht. Die Ausbeuten (40 % für DVS-Calmodulin-Sepharose versus 78 % für GST-Calmodulin-Sepharose) war signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$) und die Kapazitäten (24,1 pkat für DVS-Calmodulin-Sepharose versus 40,7 pkat für GST-Calmodulin-Sepharose) der Tendenz nach ca. zweifach höher.

Somit ist als Ergebnis festzuhalten, dass die DVS-Calmodulin-Sepharose mit dem nicht orientiert gebundenem Calmodulin ähnliche Aufreinigungseigenschaften aufwies wie das orientiert immobilisierte Calmodulin im Falle der GST-Calmodulin-Sepharose. Der erwartete funktionelle Unterschied zwischen orientiert und nicht orientiert gebundenem Calmodulin konnte nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wird in Kapitel 4 dargestellt. Auf Grund der doppelt so hohen Ausbeute und Kapazität (Tab. 7) wurde bei den nachfolgenden Chromatographien jedoch GST-Calmodulin-Sepharose an Stelle der DVS-Calmodulin-Sepharose benutzt.

3.2 **Anionenaustauschchromatographische (MonoQ) Untersuchung zur Heterogenität von uCaM Syn-F2 nach Affinitätschromatographie auf GST-Calmodulin-Sepharose**

3.2.1 Einfluss der Lagerungszeit und Calcium auf die Fraktion U-Seph-D vor Affinitätschromatographie

Die auf orientiert immobilisiertem Calmodulin eingesetzten U-Seph-D (s. 3.1.4) waren unterschiedlichen Ursprungs. Einige wurden in Gegenwart von Calcium gelagert, einige in Abwesenheit von Calcium; die Lagerungszeit variierte zwischen zwei Monaten und fünf bis sechs Jahren. Zur Charakterisierung der nach der CaM-Seph-E Präparationen erhaltenen Calmodulin-Sepharose Eluate und zur weiteren Anreicherung der uCaM Syn-F2 wurden

Tab.7: Vergleich der Präparation mittels DVS-Calmodulin-Sepharose und GST-Calmodulin-Sepharose

Präparation	Volumen Ml	Protein (mg/ml)	Aufgetragene Gesamtaktivi- tät pkat	Eluierte Gesamtaktivi- tät pkat	spez. Aktivität (pkat/mg)	Anreicherung (<i>n</i> -fach)	Ausbeute % MW	gebundene Aktivität fkat/mg Calmodulin
Präparation auf DVS- Calmodulin N=7	2,4 ± 1,7	2,4 ± 1,7	72 ± 55	24,1 ± 11,7	10,9 ± 3,6	10,7 ± 4,2	40 ± 6,8	0,4 ± 0,3
Präparation auf GST- Calmodulin N=9	1,8 ± 0,8	4,4 ± 0,9	52,3 ± 26,6	40,7 ± 22,2	11,3 ± 7,3	7,5 ± 2,7	78 ± 24	0,8 ± 0,5

Die Angaben bezüglich der Präparation auf DVS-Calmodulin-Sepharose beruhen auf den Ergebnissen von 7 Präparationen (Majetschaks et al 1998a und 1998b), die Angaben bezüglich des GST-Calmodulins beruhen auf den Ergebnissen von 9 Präparationen dieser Arbeit. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Im Falle des DVS-Calmodulins beträgt die Konzentration des gebundenen Calmodulins 4,1 mg/ml packed. Die Aktivitätsbestimmung ergab sich aus der Differenz zwischen der calciumabhängige Aktivität und der calciumunabhängigen Aktivität. Die Ausbeuten (40 % für DVS-Calmodulin-Sepharose versus 78 % für GST-Calmodulin-Sepharose) waren signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$). Die Kapazität der GST-Calmodulin-Sepharose war (40 pkat) war der Tendenz nach circa zweifach höher als die der DVS-Calmodulin-Sepharose (24,1 pkat).

verschiedene Calmodulin-Sepharose-Eluate gepoolt und diese Pools wiederum anionenaustauschchromatographisch aufgereinigt (entsprechend der in 2.3.1.4 beschriebenen Methode).

Zuerst wurde ein Pool mehrerer CaM-Seph-E Präparationen (=Calmodulin-Sepharose-Eluat-Pool 1, bestehend aus Präparationen 4, 5 und 6 der Tab. 6; s. 3.1.6) untersucht, deren Ausgangsmaterialien (U-Seph-D Pool 1) 6 Jahre in Abwesenheit von Calcium bei -80°C gelagert wurden. Bei diesem Pool ließen sich in der Anionenaustauschchromatographie drei Aktivitätsmaxima abgrenzen: bei 210 mM, 290 mM und 380 mM KCl (s. Abb. 11A). Das Eluat der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie dieses Calmodulin-Sepharose-Eluats Pool 1 wird im Weiterem CaM-Seph-E-MonoQ Pool 1 genannt. Als nächstes wurde ein Pool mehrerer Calmodulin-Sepharose-Eluat-Präparationen (s. 3.1.6) verwendet (=Calmodulin-Sepharose-Eluat-Pool 2, bestehend aus den Präparationen 1, 2 und 3 Tab. 6), deren Ausgangsmaterialien (U-Seph-D Pool 2) in Gegenwart von Calcium für fünf Jahre eingefroren waren. Wie aus der Abb. 11B hervorgeht, konnten in diesem Fall zwei Maxima abgegrenzt werden; jeweils bei 200 mM KCl und 300 mM KCl. Das Eluat der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie dieses Calmodulin-Sepharose-Eluats Pools 2 wurde CaM-Seph-E-MonoQ Pool 2 genannt. Auf Grund der oben beschriebenen unterschiedlichen Elutionsmaxima wurde eine weitere Serie von Chromatographien durchgeführt. Die Arbeitshypothese war, dass während des Einfrierens und Auftauens eine Proteolyse der Proteine (s.a. Carpenter 1999) stattfindet, die zu mehreren Aktivitätspeaks führt. Zur Reduzierung möglicher proteolytischer Vorgänge wurde „frisches“ APFII verwendet (APFII Pool 3), dem zusätzliche Proteaseinhibitoren (Trypsininhibitor, PMSF) zugefügt wurden. Weiterhin wurden APFII Pool 3 in Abwesenheit von Calcium nur für einige Wochen bei -80°C eingefroren. Dem Durchlauf des Auftrages von APFII Pool 3 auf die Ubiquitin-Sepharose (U-Seph-D Pool 3) wurde erneut zusätzliche Proteaseinhibitoren zugefügt. U-Seph-D Pool 3 wurde auf GST-Calmodulin-Sepharose aufgetragen, das so erhaltene Calmodulin-Sepharose-Eluat Pool 3 (Präparation 7, 8 und 9 Tab. 6) wurde wie zuvor mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren eingefroren. Bei der Anionenaustauschchromatographie des Eluats der CaM-Seph-E Präparation dieses Pools 3 auf MonoQ (CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3 genannt) ließen sich 70 % der Aktivität um den Bereich von 410 mM KCl eluieren (Abb. 12).

Im Falle der Calmodulin-Sepharose-Eluate Pools 1 und 2 (Abb. 11) waren die Gradientenbereiche, in denen Aktivität eluiert wurde, insgesamt größer. Bei der Anionenaustauschchromatographie des Calmodulin-Sepharose-Eluats Pools 2 wurden 80 % der Aktivität im Bereich von 200-400 mM KCl von der Säule gelöst. Hingegen wurden beim Pool 3 (Abb. 12) 90 % der Aktivität in einem schmalen Gradientenbereich zwischen 320 und 400 mM KCl

eluiert. Der Befund, dass allein durch den Einsatz zusätzlicher Proteaseinhibitoren nur noch ein Aktivitätspeak nachweisbar war, erhärtet die Hypothese, dass die unterschiedlichen Aktivitätsmaxima der Calmodulin-Sepharose-Eluate Pools 1 und 2 durch proteolytische Vorgänge beim Einfrieren und Auftauen erklärt werden können. Weiterhin ließe sich der bei Calmodulin-Sepharose-Eluate Pool 2 fehlende Aktivitätspeak bei ca. 380-400 mM KCl durch zusätzliche, durch Calcium aktivierte, Proteasen (z.B. Calpain; Kim 2002) erklären.

Diese Veränderungen beim Einfrieren und Auftauen sowie der zusätzliche Effekt der Calciumlagerung werden im Diskussionsteil besprochen. Wie in Abb. 11 gezeigt wurde, wurden die anionenaustauschchromatographischen Eigenschaften von uCaM Syn-F2 durch Einfrieren und Auftauen sowie durch Anwesenheit von Calcium verändert.

Die anionenaustauschchromatographische Aufreinigung des APFII Pools 3, das zur Herstellung des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 3 diente, zeigte auf MonoQ ein Aktivitätselutionsmaximum bei 390 mM KCl (Abb. 13). Dies entsprach ungefähr dem Ergebnis von 410 mM KCl der Anionenaustauschchromatographie des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 3 auf MonoQ (Abb. 13). Ob dieser Unterschied von 20 mM KCl zwischen beiden Maxima Ausdruck eines strukturellen Unterschieds ist, bleibt zu klären. Die in 3.3 durchgeführte Molekularmassenuntersuchung könnte eine Klärung herbeiführen. Das Eluat der Anionenaustauschchromatographie des APFII Pools 3 auf MonoQ wurde APFII-MonoQ Pool 3 genannt.

Prinzipiell ließe sich diese Beobachtung auf drei verschiedene Art und Weisen deuten:

Die Differenz zwischen den beiden Maxima ließe sich zum einem als Ergebnis einer Proteolyse im Rahmen der Präparation darstellen. Andererseits könnte dieser Unterschied auch als Ausdruck der unterschiedlichen kovalenten Modifikation der beiden uCaM Syn-F2 Fraktionen gedeutet werden. Schließlich kann dieses Ergebnis Folge experimenteller Streuung sein (s. Diskussionsteil).

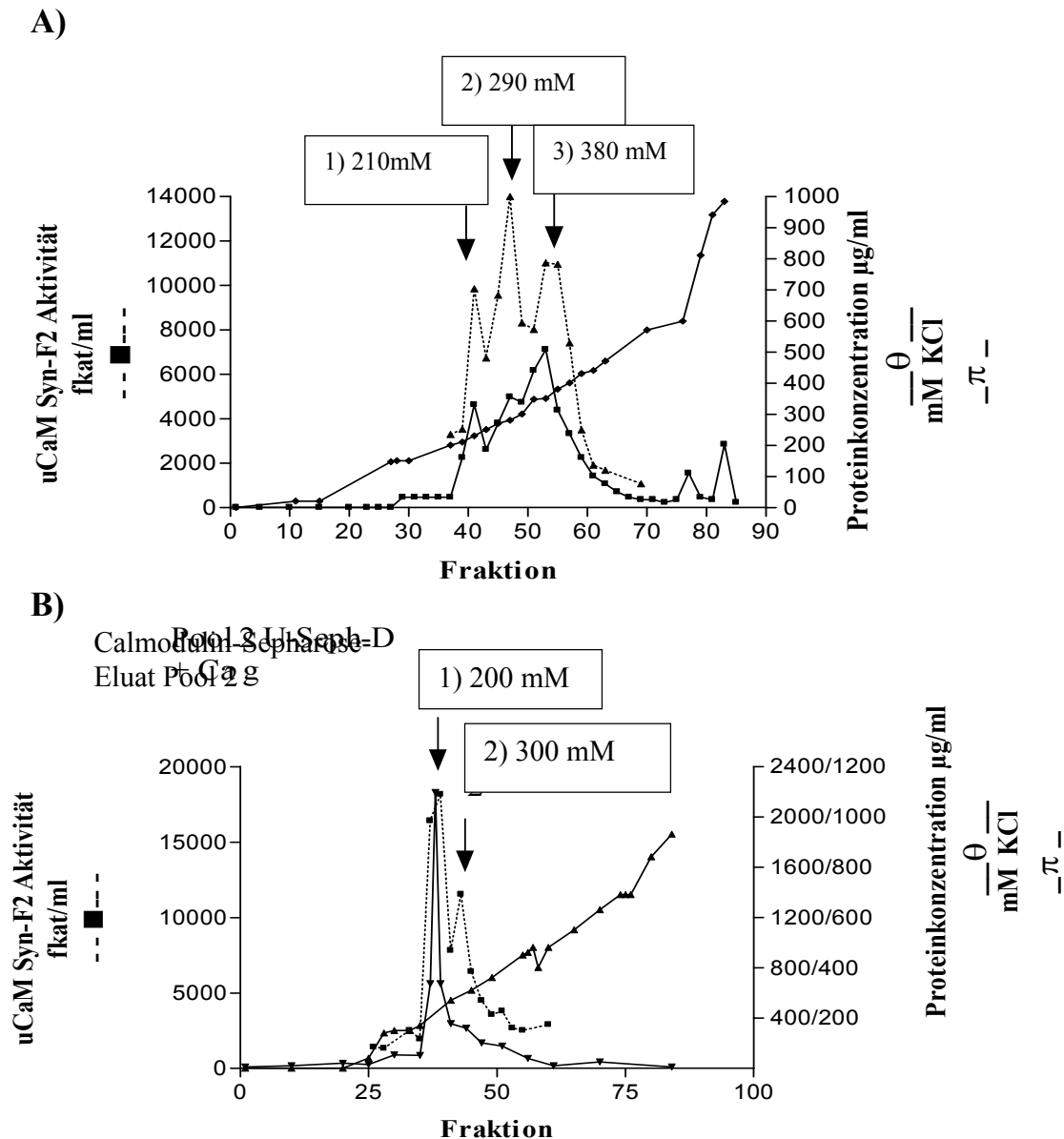


Abb. 11: Anionenaustauschchromatographie verschiedener, ohne zusätzliche Proteolyseinhibitoren eingefrorener, Calmodulin-Sepharose-Eluat-Pools

A: MonoQ-Chromatographie des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 1

Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte auf eine MonoQ Säule (0,5 cm i.D. 5 cm Gelhöhe, 1ml Gelvolumen) mit einer ihr vorgeschalteten 0,4 ml TSK HW 65 (S) Gel-Vorsäule (0,5 cm i.D. 2,4 cm Gelhöhe). Es wurden 4,5 ml eines Pools (mit einer Konzentration von 3,07 mg/ml und einer Aktivität von 25,4 nkat/mg bzw. 79,4 nkat/ml) mehrerer CaM-Seph-E Präparationen entsprechend 2.3.1.4 aufgetragen. Das Ausgangsmaterial (U-Seph-D Pool 1) dieses Pools wurde sechs Jahre in Abwesenheit von Calcium gelagert. Der Auftrag wurde mit einer Geschwindigkeit von 12 ml/h aufgetragen, mit 3 ml des Äquilibrierungspuffer nachgewaschen und schließlich wurde ein KCl Gradient (von 0 mM KCl bis 1000 mM KCl) auf das Gel aufgetragen. Die Aktivitätsbestimmung ergab sich aus der Differenz zwischen der calciumabhängigen Aktivität und der calciumunabhängigen Aktivität (s.2.4.5, spez. Radioaktivität ^{125}I -CT-Ubiquitin: 150 cpm/pMol, eingesetztes Enzymvolumen: 20 µl). Bei diesem Pool ließen sich in der Anionenaustauschchromatographie drei Maxima abgrenzen: bei 210 mM, 290 mM und 380 mM KCl. Das Eluat der MonoQ-

Anionenaustauschchromatographie dieses Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 1 wurde CaM-Seph-E-MonoQ Pool 1 genannt.

B: MonoQ-Chromatographie des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 2

Der Auftrag bestand aus einem Pool verschiedener Calmodulin-Sepharose-Eluaten, deren Ausgangsmaterial (U-Seph-D Pool 2) in Gegenwart von Calcium eingefroren wurde. Das Volumen betrug 4,5 ml bei einer Konzentration von 2,93 mg/ml. Für die Enzymaktivität wurden 14 nkat/mg bzw. 32 nkat/ml gemessen. Die weitere Vorgehensweise sowie die Aktivitätsbestimmung gestaltete sich wie im Falle der Anionenaustauschchromatographie des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 1. Das Eluat der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie dieses Calmodulin-Sepharose-Eluats Pool 2 wurde mit CaM-Seph-E-MonoQ Pool 2 abgekürzt.

Bei dieser Präparation ließen sich zwei Maxima bei 200 mM KCl und 300 mM KCl abgrenzen. Der im Bereich zwischen 450 mM KCl und 600 mM KCl auftretende kurzfristige Abfall des KCl-Gradienten lässt sich durch einen temporären Ausfall eines der Pumpen der FPLC-Anlage erklären.

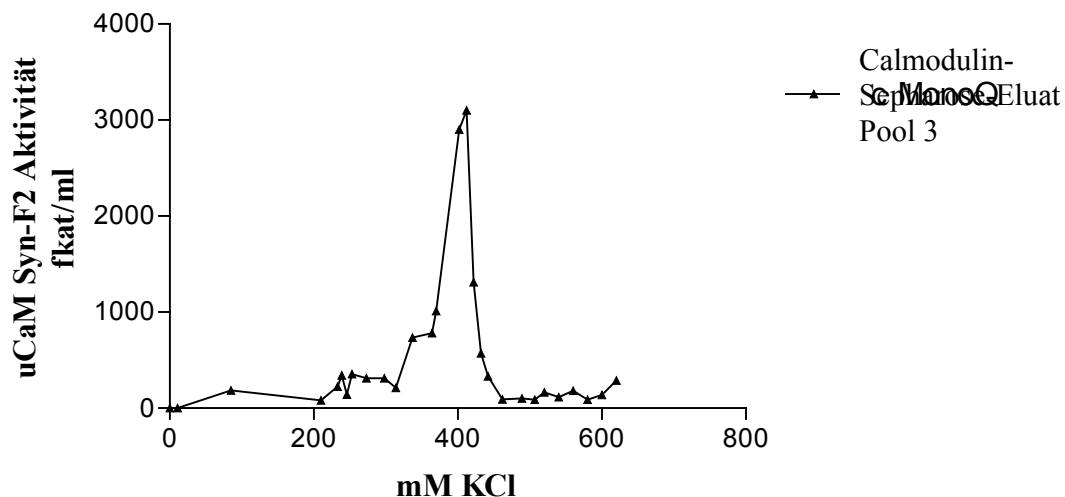


Abb. 12: Anionenaustauschchromatographie auf MonoQ von Calmodulin-Sepharose-Eluat Pool 3, dessen Ausgangsmaterial (U-Seph-D Pool 3) in Gegenwart zusätzlicher Proteolyseinhibitoren eingefroren wurde

Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte auf eine MonoQ Säule (0,5 cm I.D. 5 cm Gelhöhe, 1ml Gelvolumen) mit einer ihr vorgeschalteten 0,4 ml TSK HW 65 (S) Gel-Vorsäule (0,5 cm I.D. 2,4 cm Gelhöhe). 5 ml des ankonzentrierten Calmodulin-Sepharose-Eluate-Pools 3 mit einer Konzentration von 2,05 mg/ml wurden entsprechen 2.3.1.4 aufgetragen (Aktivität 25 nkat/mg 78nkat/ml). Calmodulin-Sepharose-Eluat Pool 3 und dessen Ausgangsmaterial (U-Seph-D Pool 3) wurden mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren eingefroren. Es wurde ein KCl Gradient gefahren, der bei 0 mM KCl begann und bei 1000 mM KCl endete. Die in diesem Versuch dargestellten Aktivitätsergebnisse stellen die Differenz zwischen der calcium-abhängigen und der calciumunabhängigen Aktivität dar (s. 2.4.5, spez. Radioaktivität 125 I-CT-Ubiquitin: 150 cpm/pMol, eingesetztes Enzymvolumen: 20 μ l). Das Aktivitätsmaximum befand sich bei 410 mM KCl. Das Eluat der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie dieses Calmodulin-Sepharose-Eluats 3 wurde CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3 genannt.

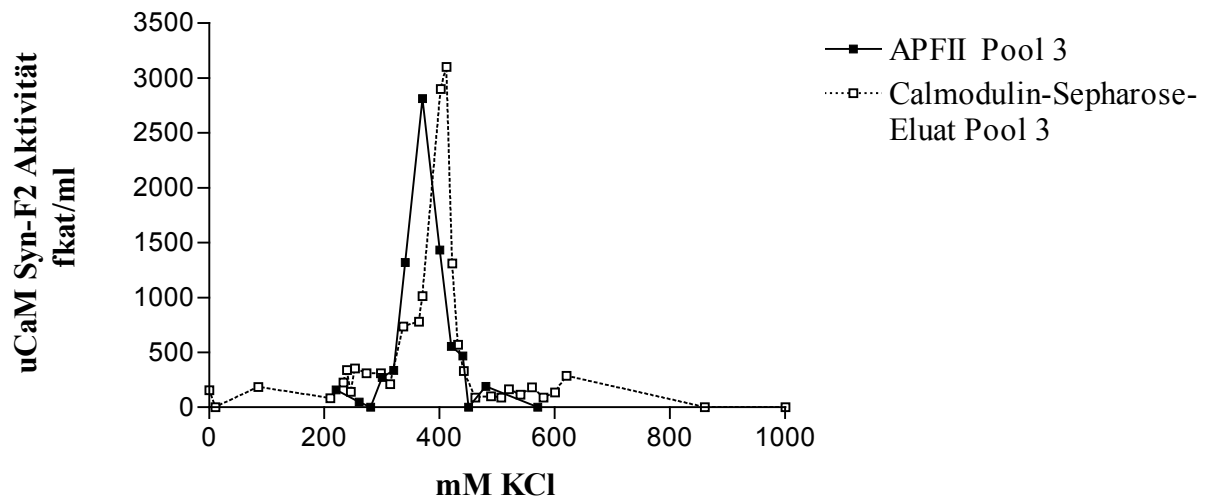


Abb. 13: Anionenaustauschchromatographie des APFII Pools 3 und Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 3 auf MonoQ:

Anionenaustauschchromatographie des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 3 (□):

Die Säulen wiesen folgende Maße auf: MonoQ Säule (0,5 cm I.D., 5 cm Gelhöhe, 1ml Gelvolumen) sowie 0,4 ml einer vorgeschalteten TSK HW 65 (S) Gel-Vorsäule (0,5 cm I.D., 2,4 cm Gelhöhe). 5 ml des ankonzentrierten CaM-Sep-Eluat Pools 3 mit einer Konzentration von 2,1 mg/ml wurden entsprechend 2.3.1.4 mit einer Geschwindigkeit von 12 ml/h aufgetragen. Anschließend wurde mit 3 ml Äquilibrationpuffer nachgewaschen. (Aktivität 25 nkat/mg 78 nkat/ml). Es wurde ein KCl Gradient gefahren, der bei 0 mM KCl begann und bei 1000 mM KCl endete. Das Aktivitätsmaximum befand sich im Bereich von 410 mM KCl. Das Eluat der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie dieses Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 3 wurde CaM-Sep-E-MonoQ Pool 3 genannt. Die Aktivitätsbestimmung ergab sich aus der Differenz zwischen der calciumabhängigen Aktivität und der calciumunabhängigen Aktivität (s.2.4.5, spez. Radioaktivität ¹²⁵I-CT-Ubiquitin: 200 cpm/pMol, 20 µl Enzymansatz)

Anionenaustauschchromatographie des APFII Pools 3 (■):

Es wurden 5 ml des APFII-Pools 3 (Proteinkonzentration 6,8 mg/ml, Aktivität 0,8 nkat/mg bzw. 5 nkat/ml) auf MonoQ aufgetragen. Die übrige Vorgehensweise gestaltete sich wie im zuvor beschriebenen Abschnitt. Das Eluat der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie dieses APFII-Pools 3 wurde APFII-MonoQ Pool 3 genannt. Das Aktivitätsmaximum befand sich im Bereich von 390 mM KCl.

Weiterhin wurde untersucht, ob die direkte anionenaustauschchromatographische Aufreinigung der uCaM Syn-F2 aus APFII ähnliche Ergebnisse aufwies wie die bisherige Aufreinigung mittels Ubiquitin- und anschließender Calmodulinaffinitätschromatographie.

Durch Anionenaustauschchromatographie des APFII Pools 3 konnte eine Aufreinigung der uCaM Syn-F2 um einen Faktor von 3,4 bei einer Aktivitätsausbeute von 17 % (in Relation zur eingesetzten Aktivität) erzielt werden (Tab. 8). Der Anreicherungsfaktor stimmte mit üblichen Ergebnissen im Rahmen der Anionenaustauschchromatographie überein. Außergewöhnlich

war jedoch der Aktivitätsverlust, welches durch Denaturierung der uCaM Syn-F2 auf dem MonoQ-Gel erklärt werden kann.

Aufreinigungsrate (7-fach) sowie die höhere Aktivitätsausbeute (ca. 70%) der GST-Calmodulin-Sepharose gegenüber (s. Tab 8).

Somit ließ sich feststellen, dass die direkte Aufreinigung der uCaM Syn-F2 aus APFII auf MonoQ keine Vorteile im Vergleich zur Aufreinigung der uCaM Syn-F2 auf Ubiquitin-Sepharose und anschließend auf GST-Calmodulin-Sepharose bietet. Aus diesem Grund wurde zur Aufreinigung der uCaM Syn-F2 die Ubiquitin- und anschließend die Calmodulinaffinitätschromatographie verwendet.

Tab 8: **Reinigungstabelle für APFII-MonoQ-Anionenaustauschchromatographie**

	Volumen ml	Aktivität				Protein
		Gesamtaktivität nkat	spezifische Aktivität nkat/mg	Anreicherungsfaktor	Aktivitätsausbeute %	Gesamtprotein mg
Auftrag	5	27	0,8	-	100	36
Durchlauf	34,5	10	0,6	0,75	37	18
Eluat 340-400 mM KCl	2,5	4,8	2,7	3,4	17	1,8

Dargestellt sind die Ergebnisse der Anionenaustauschchromatographie des APFII Pools 3 auf MonoQ. Aufgetragen wurde 36 mg des APFII-Pools 3 mit einer Gesamtaktivität von 27 nkat. Es wurden folgende Säulen verwendet: MonoQ Säule (0,5 cm I.D., 5 cm Gelhöhe, 1 ml Gelvolumen) sowie 0,4 ml einer vorgeschalteten TSK HW 65 (S) Gel-Vorsäule (0,5 cm I.D., 2,4 cm Gelhöhe). Im Rahmen dieser Präparation ließ sich für das Eluat im Bereich zwischen 340 mM KCl und 400 mM KCl nur eine Anreicherung von Faktor 3,4 bei einem Aktivitätsverlust von 83 % feststellen.

3.3 Molekulare Massenbestimmung der MonoQ-Pools mittels Gelfiltration auf Superose 6 p.g.

3.3.1 Heterogenität langzeitgelagerter Pools

In Kapitel 3.2 wurde gezeigt, dass die Anionenaustauschchromatographie von Calmodulin-Sepharose-Eluaten (Calmodulin-Sepharose Eluat Pools 1 und 2), die ohne zusätzliche Proteaseinhibitoren eingefroren wurden, mehrere Aktivitätspeaks ergab (s. Abb. 11). Andererseits wurde bei der Anionenaustauschchromatographie eines Pools von Calmodulin-Sepharose-Eluaten (Calmodulin-Sepharose-Eluat Pool 3), die mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren eingefroren wurden, nur ein einzelnes Aktivitätsmaximum gefunden (Abb. 12 und Abb. 13).

Die sich nun ergebende Frage war, ob sich diese einzelnen Aktivitätsmaxima der uCaM Syn F2 nur in ihrer Affinität zu MonoQ-Gel oder ob sie sich auch in anderen Punkten unterscheiden.

Dafür wurden diese einzelnen Aktivitätsmaxima der Anionenaustauschchromatographie gepoolt und deren molekulare Masse durch Gelfiltration auf Superose 6 p.g. bestimmt.

Die Aktivitätsmaxima 2 und 3 der Anionenaustauschchromatographie des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 1 (Abb. 11A) wurden einzeln gepoolt (näheres siehe Legende) und auf Superose 6 p.g. aufgetragen. Für Aktivitätsmaximum 2 (Peak 2, Calmodulin-Sepharose-Eluat Pool 1 Abb. 11A) ließen sich in der Gelfiltration Molekularmassen bei 2 MDa und 1,6 MDa ermitteln (in Abb. 14A wiedergegeben mit Peak 2 Pool 1). Für Aktivitätsmaximumpool 3 (Peak 3, Calmodulin-Sepharose-Eluat Pool 1 Abb. 11A) waren in der anschließenden Gelfiltration einzelne Aktivitätsmaxima der uCaM Syn-F2 bei 1,6 MDa und 280 kDa feststellbar (abgekürzt Peak 3 Pool 1, Abb. 14A).

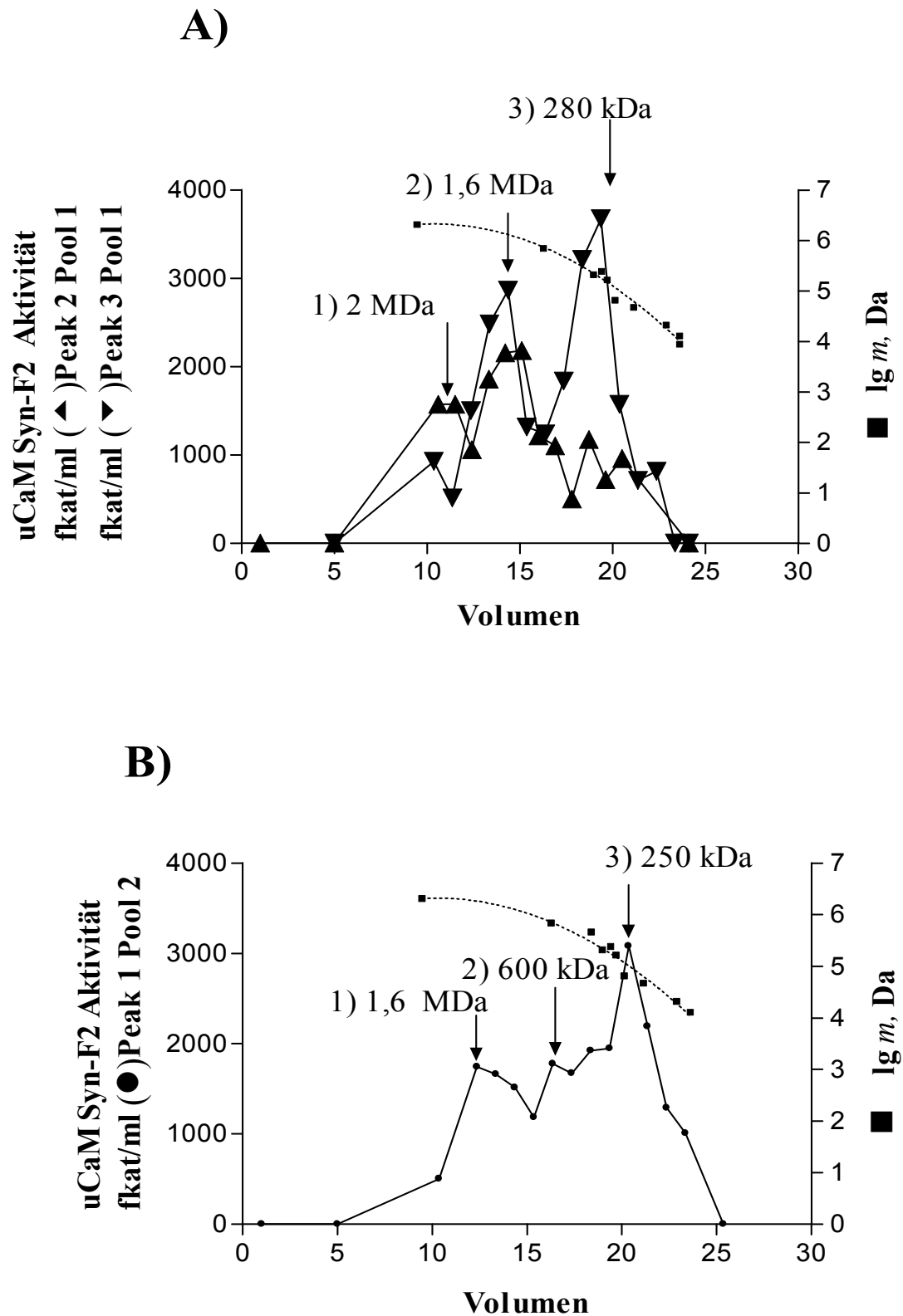


Abb. 14: Gelfiltration der CaM-Seph-E-MonoQ Pools 1 und 2, deren Ausgangsmaterialien, U-Seph-D Pool 1 und 2, ohne zusätzliche Proteaseinhibitoren eingefroren wurden

A: Peak 2 des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 1 (Peak 2 Pool 1; Pool der Fraktionen 43-47 s. Abb. 11A) wurde auf Seuperose 6 p.g. aufgetragen (entsprechend 2.3.1.5). Die Maße der Säule betrugen: 11 mm Innendurchmesser, 265 mm Gelhöhe. Aufgetragen wurden 0,5 ml einer 3,01 mg/ml Lösung mit der Aktivität 22 nkat/mg bzw. 66 nkat/ml. Die markierten Peaks der Gelfiltration entsprachen einer molekularen Masse von jeweils 2 MDa und 1,6 MDa.

Peak 3 des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 1 (Peak 3, Pool 1, Fraktionen 39-49, s. Abb. 11A) wurde gelfiltriert (entsprechend 2.3.1.5). Aufgetragen wurden 0,5 ml einer 3,5 mg/ml Lösung mit einer Aktivität von 9,9 nkat/mg bzw. 35,8 nkat/ml. Die gekennzeichneten Peaks der Gelfiltration entsprachen einer molekularen Masse von 1,5 MDa und der zweite Peak einer molekularen Masse von 280 kDa. Die Eichkurve der molekularen Masse ist mit „----“, wiedergegeben (lg m, Logarithmus zur Basis 10 der molekularen Masse). Dabei ist anzumerken, dass der Molekularmassenbereich zwischen 600 kDa und 2 MDa nur eine Extrapolation darstellt und dass die molekulare Masse von 2 MDa auf der Laufeigenschaft von Dextran-Blau beruht. Als Standards dienten Dextranblau, Thyreoglobulin, Ferritin, Katalase, Amylase, IgG, Ovalbumin, BSA, Cytochrom c und Ubiquitin. Die Aktivitätsbestimmung ergab sich aus der Differenz zwischen der calciumabhängigen Aktivität und der calciumunabhängigen Aktivität (s. 2.4.5, spez. Radioaktivität ^{125}I -CT-Ubiquitin: 200 cpm/pMol, eingesetztes Enzymvolumen: 20 μl). Bezüglich der Lagerungsbedingungen des Calmodulin-Sephrose-Eluat Pools 1 siehe Abb. 11 A

B: *Peak 1 des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 2 (Peak 1 Pool 2, Fraktionen 35-43, s. Abb. 11B) wurde entsprechend 2.3.1.5 auf die Superose 6 p.g. aufgetragen. Das Volumen dieses ankonzentrierten Pools betrug 500 μl , die Konzentration entsprach 5,3 mg/ml. Die Aktivität dieses Pools belief sich auf 20,9 nkat/mg bzw. 90 nkat/ml.*

Übrige Vorgehensweise sowie die einzelnen eingesetzten Standards stimmten mit bei Abb. 14A überein. Die Bodenzahl betrug ca. 4500/m. Bezüglich der Lagerungsbedingungen des Calmodulin-Sephrose-Eluat Pools 2 sei auf Abb. 11 B verwiesen.

Die zusammengeführten Fraktionen um Aktivitätsmaximum 1 des Calmodulin-Sephrose-Eluat-Pools 2 (Peak 1, Calmodulin-Sephrose-Eluat Pool 2, Abb. 11B) ergaben in der anschließenden Gelfiltration uCaM Syn-F2 Aktivitätsmaxima im Bereich von 1,6 MDa, 600 kDa und 250 kDa (siehe hierzu Kurvenverlauf von Peak 1, Pool 2, Abb. 14B).

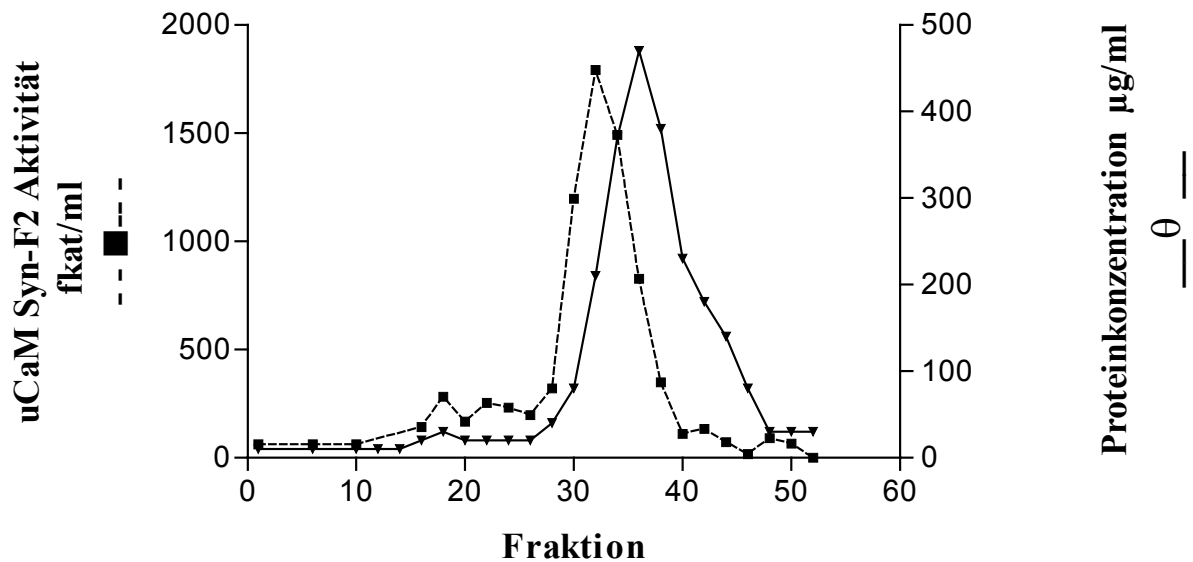
3.3.2 Vergleich der Molekularmassen der anionenaustauschchromatographisch gereinigter APFII-MonoQ Pool 3 und CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3, die mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren gelagert wurden

Wie in Kapitel 3.2 gezeigt, unterschieden sich die anionenaustauschchromatographischen Aktivitätsmaxima des APFII-Pools 3 (APFII-MonoQ Pool 3 genannt, Abb. 13) sowie des Calmodulin-Sephrose-Eluat-Präparation Pools 3 (CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3 genannt, Abb. 13), obwohl beide Fraktionen dem selben Pool 3 entstammten und mit zusätzlichen Proteolyseinhibitoren eingefroren wurden. Die sich nun stellende Frage war, ob dieser Unterschied Ausdruck eines echten strukturellen Unterschieds ist. Dazu wurden die Aktivitätsmaxima der jeweiligen Chromatographie auf MonoQ-Gel gepoolt (näheres siehe Legende) und die molekulare Masse dieser beiden Pools durch Gelfiltration bestimmt.

Bei der Gelfiltration des APFII-MonoQ Pools 3 waren Aktivitätsmaximum und Proteinpeak nicht deckungsgleich (Abb. 15A), da uCaM Syn-F2 auf dieser Stufe nicht in dem Maße angereichert war wie beim CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3. Hingegen stimmten bei der CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3 Gelfiltration Aktivitätspeak und Proteinpeak überein (Abb. 15B), da

uCaM Syn-F2 bereits in einem größeren Rahmen angereichert worden war. Als Ergebnis ist festzuhalten, dass beide Ansätze die gleiche molekulare Masse (437 kDa) aufwiesen (Abb. 16). Somit ist der geringfügige Unterschied (bezogen auf die KCl Konzentration) der beiden Aktivitätsmaxima des APFII-MonoQ Pools 3 und des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 3 (s. Abb. 13) eher als experimentelle Streuung zu deuten.

A)



B)

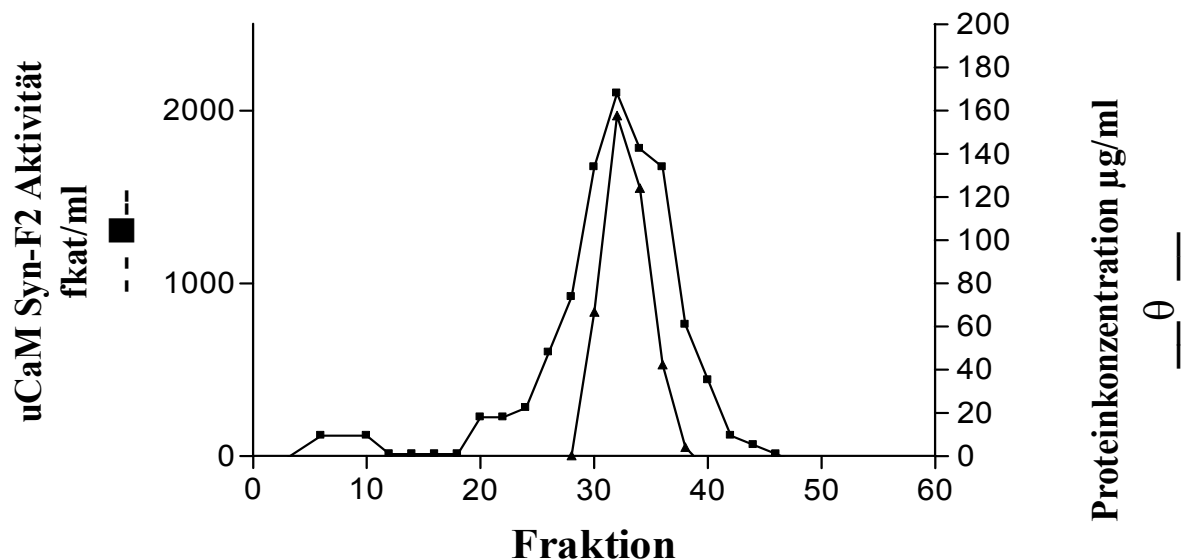


Abb. 15: Gelfiltration der CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3- und der APFII-MonoQ Pool 3-Aktivitätsmaxima, deren Ausgangsmaterial (U-Seph-D Pool 3) mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren eingefroren wurde.

A: APFII-MonoQ Pool 3:

Es wurden 400 µl eines Pools (1,54 mg/ml) der Fraktionen 52-56 der Anionenaustauschchromatographie des APFII Pools 3 (APFII-MonoQ Pool 3 s. Abb. 13) aufgetragen. Die Aktivität betrug 6,6 nkat/mg bzw. 11 nkat/ml.

Die Gelfiltration erfolgte entsprechend 2.3.1.5. Die Säulenhöhe betrug 265 mm bei einem Innendurchmesser von 11 mm. Die Aktivitätsbestimmung ergibt sich aus der Differenz zwischen der calciumabhängigen Aktivität und der calciumunabhängigen Aktivität (spez.

Radioaktivität ^{125}I -CT-Ubiquitin: 200 cpm/pMol, eingesetztes Enzymvolumen: 20 μl). Die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml. Als Standards dienten Thyreoglobulin (668 kDa), Ferritin (440 kDa), IgG G (160 kDa), Aldolase (158 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Chymotrypsin (Cytochrom c (12,4 kDa). Das hierbei festgestellte Aktivitätsmaximum lag bei einer molekularen Masse von 437 kDa (s. Abb. 16).

B: CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3

Es wurden 500 μl des Pools der Fraktionen 44-48 des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 3 (s. Abb. 12) mit einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml (Aktivität des Pools 6,5 nkat/mg bzw. 10 nkat/ml) auf die oben beschriebene Säule aufgetragen. Der Durchlauf wurde in Fraktionen zu 0,5 ml aufgefangen. Übrige Vorgehensweise gestaltete sich wie in Abb. 15A.

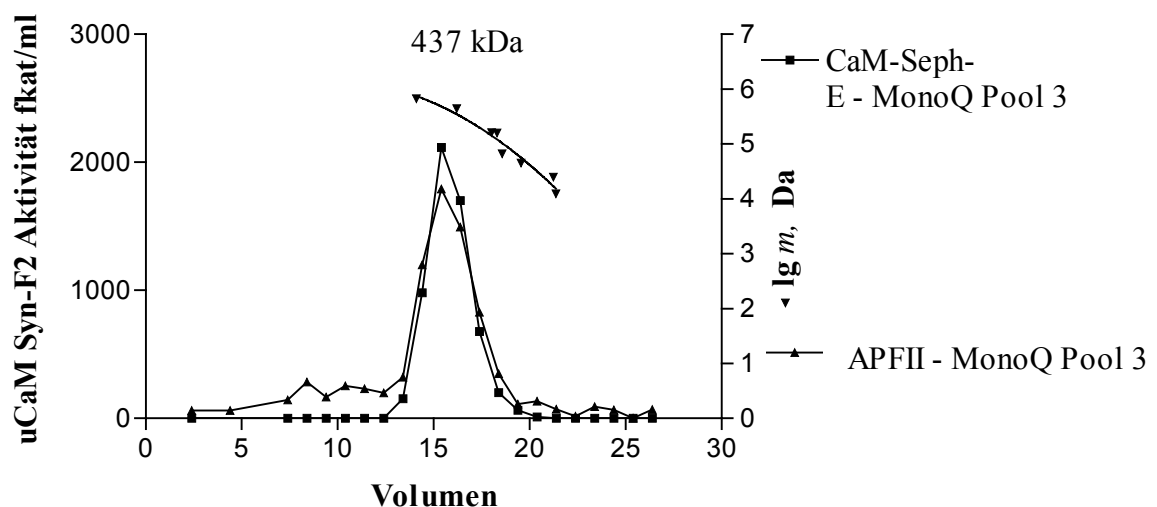


Abb. 16: Gelfiltration des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 3 und des APFII-MonoQ Pools 3, welche mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren eingefroren wurden

Die Abbildung beruht auf den Ergebnissen der Gelfiltration der beiden Läufe (s. Abb. 15A und 15B). Bei beiden Läufen wurde eine molekulare Masse von 437 kDa für die Aktivitäts-maxima festgestellt.

3.3.3 Zusammenfassung der Affinitäts-, MonoQ und Gelfiltrationsschritte

Ausgehend von den oben beschriebenen verschiedenen Chromatographieläufen wird die Aufreinigung der uCaM Syn-F2 in Tabelle 9 dargestellt. UCaM Syn-F2 konnte durch Hintereinanderschaltung verschiedener Chromatographieschritte 290-fach angereichert werden. Durch erstmalige Verwendung orientiert immobilisierten Calmodulins wurde uCaM Syn-F2 nach Affinitätschromatographie der APFII-Fraktion auf GST-Calmodulin-Sepharose ca. vierfach angereichert. In der darauffolgenden Anionenaustauschchromatographie auf MonoQ gingen 90 % der Aktivität (Rückgang der Ausbeute von 28% auf 2,8 %) verloren. Die Anreicherung konnte jedoch nur von 93-fach auf 110-fach

gesteigert werden. In der abschließenden Gelfiltration konnte uCaM Syn-F2 noch einmal um den Faktor 2,8 (von 110-fach auf 290-fach) angereichert werden. Der Aktivitätsverlust betrug etwa 50 % (Ausbeuterückgang von 2,8 % auf 1,4 %).

Die hohen Aktivitätsverluste der Anionenaustauschchromatographie verhinderten weitere Aufreinigungsschritte, da nach der Gelfiltration nicht mehr genügend Material zur Verfügung stand. In weiteren Ansätzen müsste die Anionenaustauschchromatographie durch Anwendung anderer Chromatographieschritte ersetzt werden.

Die Fraktion der Gelchromatographie des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 3, die die höchste Aktivität aufwies, sowie die jeweils benachbarte Fraktion wurden gepoolt (Gelchromatographie Pool 3, Fraktionen 32-34) und mittels Acrylamid-SDS-Gelelektrophorese analytisch aufgetrennt (Abb. 17). Auffällig ist eine Bande mit einer molekularen Masse zwischen 96 kDa und 138 kDa, die sich auf der höchsten Reinigungsstufe sehr stark anreichert, sowie zwei Banden im Bereich einer molekularen Masse zwischen 45 kDa und 36 kDa.

Um jedoch aus diesem Gemisch von verschiedenen Proteinen uCaM Syn-F2 oder zumindest eine seiner Komponenten zu identifizieren, wird in Kapitel 3.4 ein anderer Weg beschritten.

Tab. 9: **Reinigungstabelle der uCaM Syn-F2-Anreicherung**

	Protein		Aktivität			
	Volumen ml	Konzentration mg/ml	Gesamtaktivität pkat	Aktivität nkat/mg	Anreicherung	Ausbeute %
Lysat	69	59	205	0,05	1	100
APFII	14	7,4	113	1,09	22	55
CaM-Seph-E-Affinitätsschritt	6,3	1,98	58	4,64	93	28
MonoQ-Schritt	0,5	2,2	6,1	5,5	110	2,8
Gelfiltrationsschritt	1,5	0,13	2,9	14,5	290	1,4

Reinigungstabelle für die Anreicherung des uCaM Syn-F2. Die Ausbeute bezieht sich auf die Ausgangsaktivität im Lysat des Pools 3. UCaM Syn-F2 Pool 3 konnte 300-fach angereichert werden, wobei sich nur 1,4 % der Ausgangsaktivität wiederfanden. APFII steht für APFII Pool 3, CaM-Seph-E-Affinitätsschritt für Calmodulin-Sepharose-Eluat Pool 3 und MonoQ für CaM-Seph-E-MonoQ Pool 3. Die Gelfiltration bezeichnet die Gelfiltration des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 3. Bezüglich der Aktivitätsbestimmung s. 2.4.5.

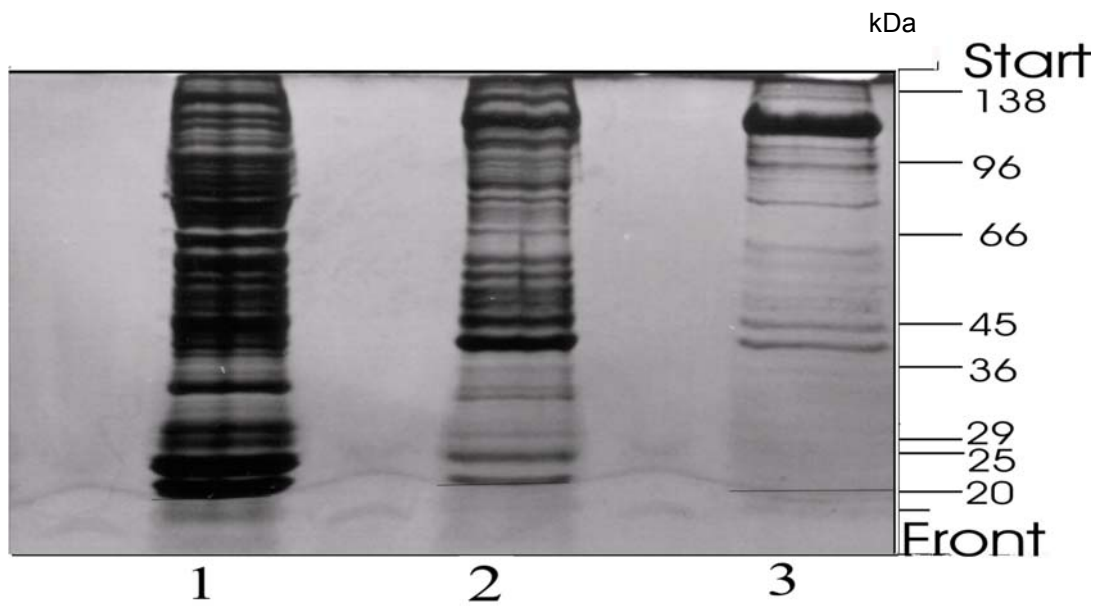


Abb. 17: **Einzelne Präparationsstufen der uCaM Syn-F 2, wobei APFII Pool 3 als Ausgangsmaterial diente**

Aufgetragen wurde auf ein 10 % Polyacrylamid- SDS-Gel:

Bahn 1: 54 µg APFII Pool 3

Bahn 2: 20 µg des Calmodulin-Sephrose-Eluat Pools 3

Bahn 3: 7 µg des Gelfiltrationspools des CaM-Seph-E-MonoQ Pools 3

Die Gelfiltration und die uCaM Syn-F2-Präparation auf GST-Calmodulin entstammten einer gemeinsamen Aufreinigungsreihe (Pool 3, s. 3.2.1).

3.4 Analyse des angereicherten Calmodulin-Sephrose-Eluat Pools auf Calmodulin bindende Proteine mit Hilfe eines Overlays

Nach Durchführung der Gelfiltration war uCaM Syn-F2 ca. 290 fach angereichert (s. Tabelle 9), so dass Komponenten von uCaM Syn-F2 analytisch durch ein Overlayverfahren hätten darstellbar sein können. Allgemein einige Erläuterungen zum Overlayverfahren:

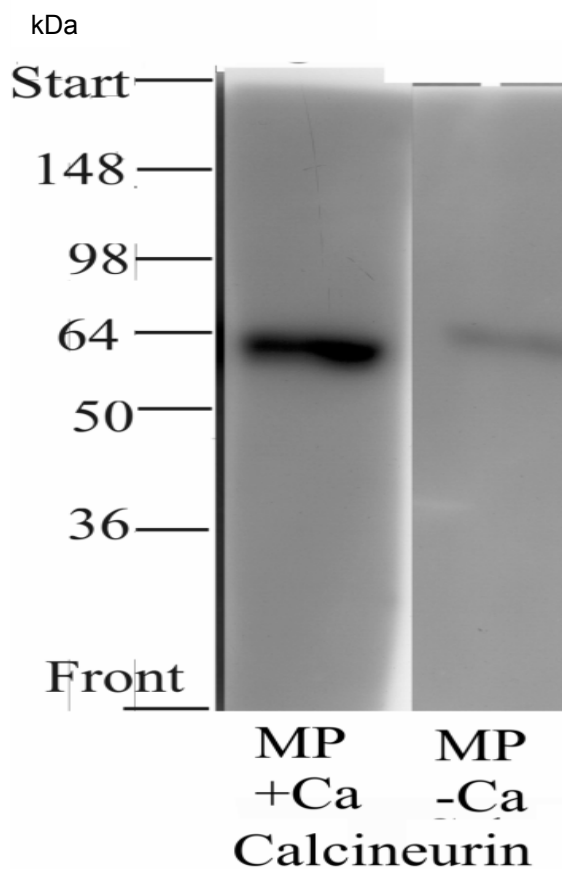
Nach elektrophoretischer Auftrennung einer uCaM Syn-F2-haltigen Fraktion in Gegenwart von SDS werden die einzelnen Banden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Da uCaM Syn-F2 Calmodulin (Majteschak et al. 1998a, Majetschak et al. 1998b) bindet, sollte nach Inkubation der Blott-Membran mit radioaktiv markiertem Calmodulin uCaM Syn-F2, oder zumindest die Calmodulin bindende Komponente von uCaM Syn-F2, nachweisbar sein.

Um eine unspezifische Bindung des Calmodulins an die Blott-Membran zu verhindern, müssen die unspezifischen Bindungsstellen der Blottmembran mit einem Blockierprotein abgesättigt werden. Die durchgeführten Overlays erfolgten in Anlehnung an die Methode der Arbeitsgruppe Berchtolds (Fischer et al. 1996). Zunächst wurde mittels Chloramin T radioaktiv markiertes Calmodulin verwendet. Jedoch konnten damit keine positive Overlays durchgeführt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Daher wurde ähnlich der Publikation von

Berchtold radioaktiv markiertes BH-Calmodulins verwendet (Fischer et al. 1996). Ein besonderer Aspekt dieses Calmodulin-Overlays war der Calciumeffekt. Calmodulin bindet nur in Gegenwart von Calcium an andere Proteine. In den Overlays, die in Abwesenheit von Calcium (dies wurde erreicht durch Zusatz des Chelatbildners EGTA) durchgeführt wurden, ließen sich keine Banden nachweisen. In den ersten Versuchen, analog der Berchtoldschen Methode, wurden als Positivkontrollen die Calmodulin bindenden Proteine Calcineurin sowie die γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase verwendet. Die γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase ist aus dem Grunde interessant, da sie ähnlich uCaM Syn-F2 Teil eines größeren Enzymkomplexes ist. Analog der von Berchtold beschriebenen Methode konnte Calcineurin nachgewiesen werden, jedoch war die γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase nicht darstellbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Sollte der Nachweis der γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase durch die oben beschriebene Methode nicht möglich sein, so könnte auch der Nachweis Calmodulin bindender Proteinen in der uCaM Syn-F2 misslingen. Was könnten jedoch die Gründe sein, dass die Detektion der γ -Untereinheit nicht gelang? Vor Auftrag der Proben auf ein Acrylamid-SDS-Gel wurden die Proteine standardmäßig drei Minuten bei 95 °C in SDS erhitzt und denaturiert (Fischer et al. 1996). Durch diese Bedingung kann die Tertiärstruktur der calmodulinbindenden Proteine in der Weise verändert werden, dass sie Calmodulin nicht mehr binden. Auch durch Nachwaschprozeduren mit den Substanzen Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff (Fischer et al. 1996) kann Calmodulin von schwach calmodulinbindenden Proteinen (mit einer niedrigen Affinität zu Calmodulin) heruntergewaschen werden, so dass diese Proteine nicht mehr nachgewiesen werden können. Daher wurde die Denaturierungstemperatur auf 55°C gesenkt und auf Nachwaschen mit Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff verzichtet. Nunmehr war die calmodulinbindende Untereinheit der Phosphorylase Kinase nachweisbar (Abb. 19). Aufbauend auf diesen Ergebnissen, wurden die weiteren Overlays mit Milchprotein als Blockierprotein durchgeführt. Ein so durchgeführter Overlay ist in Abb. 18 dargestellt. Es gelang der Bandenachweis des Calcineurins als Positivkontrolle, zudem wies der Calcineurin-Ansatz auch einen Calciumeffekt auf (Abb. 18A). Es ließen sich jedoch in der APFII-Probe keine calmodulinbindenden Proteine nachweisen (Abb. 18 B).

Milchprotein als Blockierprotein

A)



B)

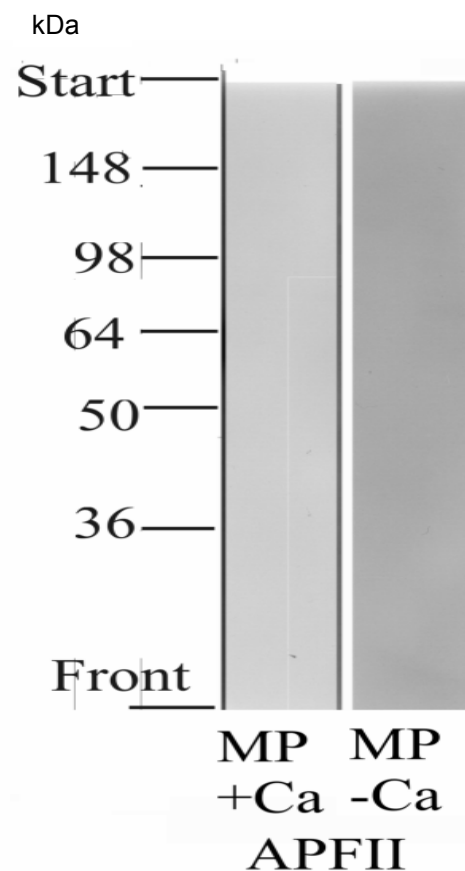


Abb. 18: Calmodulin-Overlay, Milchprotein als Blockierprotein

A: Es wurde 3,75 μg Calcineurin inkubiert mit 3 ml $\text{BH-}^{125}\text{I}$ Calmodulin (Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$, Aktivität von 1 Mio. counts per minute (cpm)). Die Präparation erfolgte analog 2.4.4. Die Calcium freien Ansätze wurden in Gegenwart von 20 mM EGTA durchgeführt. In diesem Overlayansatz war ein Calciumeffekt nachweisbar, dies bedeutet, die Bande im calciumhaltigen Overlayansatz (18 A, linke Hälfte) tritt deutlich stärker hervor als die Bande im calciumfreien Overlayansatz.

B: In einem weiteren Ansatz wurde 52 μg APFII Pool 3 inkubiert mit 3 ml 1 $\mu\text{g/ml}$ $\text{BH-}^{125}\text{I}$ Calmodulin (Aktivität 1 Mio cpm/ μg). Übriger Ablauf wie unter A dargestellt. In diesem Versuchsansatz waren keine Banden darstellbar.

Aus diesem Grunde wurde als Blockierprotein an Stelle des standardmäßig benutzten fettarmen Milchproteins bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

Mit dieser Modifikation gelang erstmalig der Nachweis von Banden in den Präparationsstufen von uCaM Syn-F2 (Abb. 19). Dafür ging die Calciumabhängigkeit verloren. Dies bedeutet, dass auch die calciumfreien Ansätze Banden aufwiesen. Dies gilt sowohl für die einzelnen Aufreinigungsstufen von uCaM Syn-F2 als auch für Calcineurin (Abb.19)

Im einzelnen sind in Abb. 19 folgende Ansätze dargestellt:

Die calmodulinbindende Proteine Calcineurin und die γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase wurden auf Bahn 1 und 2 aufgetragen. Die calciumfreie Kontrolle für Calcineurin ist auf Bahn 6 aufgetragen.

Bei der APFII Pool 3 Probe ließen sich erwartungsgemäß mehrere (sechs, Bande 1-6 Bahn 3, Abb. 19) calmodulinbindende Proteine nachweisen. APFII stellt den ersten Zwischenschritt zur Aufreinigung der uCaM Syn-F2 dar, es enthält somit ein Gemisch verschiedenster Proteine, darunter auch weiterer Calmodulin bindender Proteine, die nicht Teil der uCaM-Synthetase sind. Bei der Overlay-Untersuchung des Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 3 ließen sich nur noch drei Calmodulin bindende Banden (Bande 7-9, Bahn 4, Abb. 19) darstellen. Einige Calmodulin bindende Proteine waren somit im Rahmen der CaM-Seph-E Präparation „abgetrennt“ worden (Bande 1, 2, 5, Bahn 4, Abb. 19).

Die im Verlauf der uCaM Syn-F2 Präparation erzielte höchste Reinigungsstufen waren die Fraktionen 32-34 (mit einer molekularen Masse von 437 kDa) der Gelfiltration (s. Abb. 16). Der Overlay dieser gepoolte Fraktionen wies nur noch eine Bande (Bande 10, Bahn 5) mit einer molekularen Masse von ca. 31 kDa auf.

Banden mit ähnlichen molekularen Massen waren auch in den anderen Overlayansätzen nachweisbar (Bande 3, Bahn 3 und Bande 7, Bahn 4). Auf Grund dieser Ergebnisse kann die Vermutung geäußert werden, dass diese calmodulinbindende Bande einer Komponente der uCaM Syn-F2 zugehörig ist. Letztendliche Gewissheit erlangt man aber nur durch Reindarstellung des Enzyms. Allgemein sind durch diese Overlay-Methode Proteine mit einer niedrigen Affinität (uCaM Syn-F2) zu Calmodulin als auch Proteine mit einer hohen Affinität zu Calmodulin (z.B. Calcineurin) nachweisbar.

Da nicht alle Overlays hier besprochen werden können, werden die Ergebnisse in Tab. 10 zusammengefügt. Die hierbei erhaltenen Resultate hinsichtlich der molekularen Massen und Zahl der nachweisbaren Banden auf den jeweiligen Präparationsstufen stimmen mit den in Abb.19 gezeigten Ergebnissen gut überein. Auffällig ist jedoch das Ergebnis, dass die γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase in der Analyse eine apparente molekulare Masse von 38 kDa aufwies, obwohl seine tatsächliche molekulare Masse 45 kDa beträgt.

Tab. 10: **Molekulare Masse der Calmodulin-Overlay-Banden**

Molekulare Masse der Banden in kDa							
Molekulare Masse Bereich	0-25	25-29	30-35	36-39	40-60	60-150	150-300
APFII-Präparationen und CaM-Seph-Eluate N=6 MW \pm SD	21,7 \pm 0,9	26,8 \pm 0,6	29,8 \pm 1,3		50,6 \pm 1,1	145	261
Calcineurin N=3 MW \pm SD					56,3 \pm 4		
Phosphorylase-Kinase N=2 MW				38,2			

Die einzelnen Reinigungsstufen der uCaM Syn-F 2 Aufreinigung wurden mittels Calmodulin-Overlays untersucht. Die Calmodulin-Overlays wurden gemäß 2.4.4 durchgeführt. Die Auswertung der Overlays erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms "1D gel analysis" der Fa. Nonlinear Dynamics. Die publizierte molekulare Masse des Calcineurins beträgt 59 kDa. Dies stimmt in Annäherung mit der hier bestimmten molekularen Masse von 56 kDa überein und spiegelt die Güte der molekularen Massenbestimmung wieder. Eine in allen Aufreinigungsstufen nachweisbare Bande wies eine molekulare Masse von ca. 30 kDa auf.

BSA als Blockierprotein

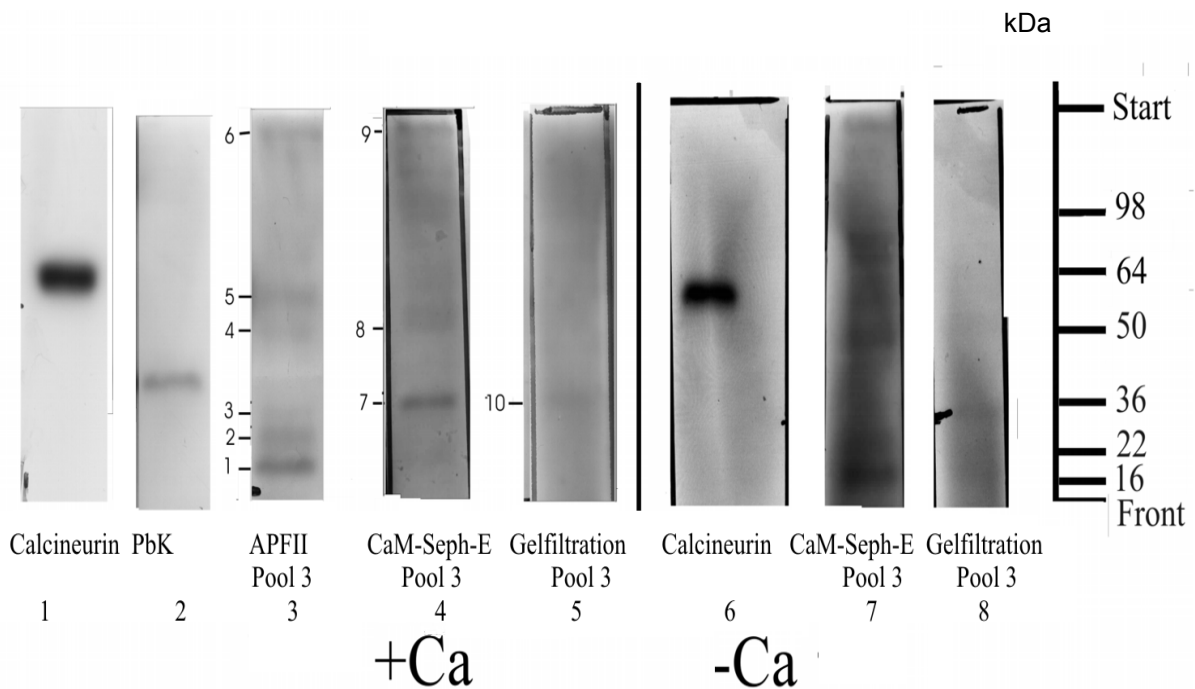


Abb. 19: Calmodulin-Overlays verschiedener Fraktionen der uCaM Syn-F2 Aufreinigung; BSA als Blockierprotein

Folgende Proteine wurden auf ein 10 % Acrylamid-SDS-Gel aufgetragen:

Bahn 1 (+Ca²⁺ Probe): 3,8 µg Calcineurin inkubiert mit 3 ml einer nach Bolton-Hunter (im Folgendem BH-Calmodulin genannt) markiertem ¹²⁵I-BH-Calmodulin (Konzentration 1 µg/ml) mit einer Aktivität von 1 Mio. Counts-per-minute (cpm). Calciumkonzentration: 1mM.

Bahn 2 (+Ca²⁺ Probe): 40 µg Phosphorylase Kinase (PbK, γ-Untereinheit, 45 kDa), Inkubation mit 3 ml einer 10µg/ml ¹²⁵I-BH-Calmodulin (Aktivität: 1 Mio. cpm/µg), 1mM CaCl₂.

Bahn 3 (+Ca²⁺ Probe): 52 µg von APFII-Pool 3: Inkubation mit 3 ml einer ¹²⁵I-BH-Calmodulin (Aktivität: 1 Mio. cpm/µg), 1mM CaCl₂.

Bahn 4 (+Ca²⁺ Probe): 40 µg einer Calmodulin-Sephrose-Eluat Präparation Pool 3 (CaM Seph-E Pool 3) Inkubation mit 3 ml einer 1 µg/ml ¹²⁵I-BH-Calmodulin (Aktivität: 1 Mio. cpm/µg), 1mM CaCl₂.

Bahn 5 (+Ca²⁺ Probe): 6 µg des Pools der Fraktionen 32-34 der CaM-Seph-E MonoQ Pool 3 Gelfiltration. Inkubation mit 3 ml einer 10µg/¹²⁵I-BH-Calmodulin (Aktivität: 1 Mio. cpm/µg), 1mM CaCl₂.

Bahn 6 (-Ca²⁺ Kontrolle): Kontrolle zur Bahn 1. Inkubationslösung enthielt zusätzlich 20 mM EGTA zur Bindung des Calciums

Bahn 7 (-Ca²⁺ Kontrolle): Kontrolle zur Bahn 4 Inkubationslösung enthielt zusätzlich 20 mM EGTA zur Bindung des Calciums.

Bahn 8 (-Ca²⁺ Kontrolle): Kontrolle zur Bahn 5 Inkubationslösung enthielt zusätzlich 20 mM EGTA zur Bindung des Calciums.

Standards (Pre-Stained-Sea-Blue II), da die Standards mit einem Farbmolekül gekoppelt sind, unterscheiden sich die angegebenen molekularen Massen von denen in der Literatur angegebenen Werten (BSA: 98 kDa; Glutamatdehydrogenase: 64 kDa; Alkoholdehydrogenase: 50 kDa, Carbonikanhydrase: 36 kDa; Myoglobin rot: 22 kDa, Lysozym: 16 kDa)

3.5 Bioinformatische Analyse der Calmodulin-Kopplung im Hinblick auf den Vergleich einer orientierten und nicht orientierter Kopplung

Die Ergebnisse der Aufreinigung der uCaM Syn-F2 auf GST-Calmodulin-Sepharose und DVS-Calmodulin-Sepharose unterschieden sich nicht im Anreicherungsfaktor (10,7 versus 7,5) oder der erzielten spezifischen Aktivität im Eluat (10,9 pkat/mg versus 11,3 pkat/mg) sondern nur in der Ausbeute (Tab. 7). Die zielgerichtete Orientierung erbrachte somit hinsichtlich der Affinitätschromatographie keinen großen Vorteil im Vergleich zur nicht orientierten, zufälligen Immobilisierung. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den geäußerten Erwartungen (s. 3.1.1).

Parallel zu den hier dargestellten Ergebnissen erschien 2003 eine Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Wilchek über die verschiedenen Orientierungen von Proteinen bei der Bromcyankopplung (Wilchek und Miron 2003). Durch Zugabe von Bromcyan zur Sepharose entsteht ein Cyanatester. In einem zweiten Schritt wird das zu koppelnde Protein hinzugefügt und über die Aminogruppe der Lysinseitenkette an den Cyanatester gebunden (Abb. 20). Es entsteht dabei ein Isoharnstoffproteinderivat. In dem neuen von Wilchek und Marion beschriebenen Schritt kann durch Zugabe von Ammoniumhydroxid das Eiweißmolekül (NH_2P) wieder abgespalten werden, wobei das Lysin in ein Homoarginin verwandelt wird. Dadurch wird die Kopplungsaminosäure identifizierbar.

Das abgespaltene Protein wird dann sequenziert und aus der Information über die Position der Homoarginingruppe kann die Lysinposition bestimmt werden, über die das Protein an die Sepharose gebunden wurde. Als Ergebnis stellte die Arbeitsgruppe Wilchek fest, dass Ribonuclease ausschließlich nur über zwei Lysine (Lys 19 und Lys 98) von acht an die Sepharose gebunden wird.

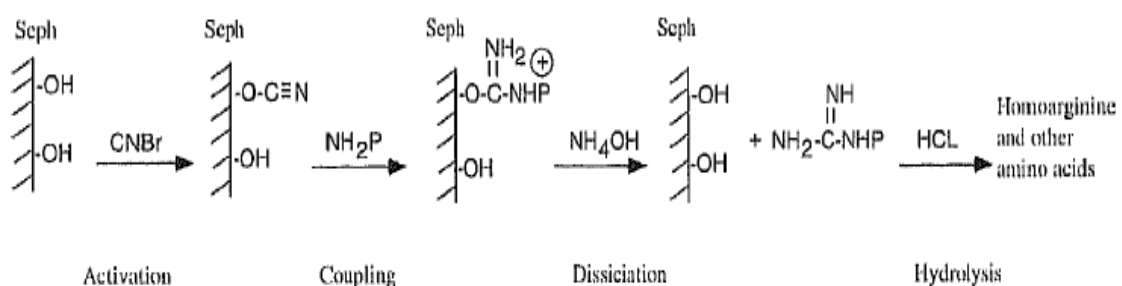


Abb. 20: **Kovalente Kopplung und Hydrolyse der Ribonuclease an die Bromcyan-aktivierte Sepharose (englischsprachige Darstellung)**

Dargestellt ist die Kopplung der Ribonuclease an Sepharose.

Zunächst wird die Sepharose durch Bromcyan (CNBr) aktiviert. An das entstehende Cyanatester wird dann das jeweilige Protein (NH_2P) über die Aminogruppe der Lysinseitenkette gebunden. Durch anschließende Gabe von Ammoniumhydroxid wird eine Dissoziation des Isoharnstoffderivatproteins bewirkt. Im Rahmen dieser Dissoziation entsteht eine Homoargininogruppe. In der anschließenden Proteinsequenzierung kann diese Homoargininogruppe detektiert werden (Wilchek und Miron 2003).

Aufbauend auf den eigenen Ergebnissen sowie den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Wilchek wurde folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

Sollte im Falle des Calmodulins, ähnlich wie im Falle der Ribonuclease, die Kopplung an die Sepharose nur durch einige (ein oder zwei) Lysine und nicht durch alle Lysine erfolgen, bestünde schon somit eine „Art gerichtete Immobilisierung“.

Wenn diese sterischen Ausrichtugen die Interaktion mit calmodulinbindenden Proteinen nicht behindern würden, würde sich diese ungerichtete Immobilisierung von den Aufreinigungseigenschaften her nicht wesentlich von der gerichteten Immobilisierung des Calmodulins unterscheiden.

Die Ribonuclease wird daher hier als Beispiel herangezogen, um auf bioinformatischer Basis mögliche Gründe für die Bevorzugung einiger weniger Lysine im Verlauf der Kopplung zu finden. Parallel dazu sollten diese Erklärungsansätze auf die Sepharose-Kopplung des Calmodulins übertragen werden. Sollte eine Modellvorstellung gefunden werden, weshalb die Ribonuclease nur mittels zwei der acht Lysine an die Sepharose gekoppelt wurde, so könnte diese Hypothese auch die affinitätschromatographischen Ergebnisse der nicht-orientierten Calmodulinimmobilisierung verständlich machen.

Zunächst wird in Abb. 21 die Struktur der Ribonuclease dargestellt.

Die Lysine der Ribonuclease sind rot hervorgehoben. Zusätzlich sind die Lysine, über die die Ribonuclease an die Sepharose gebunden wurde, mit Pfeilen markiert.

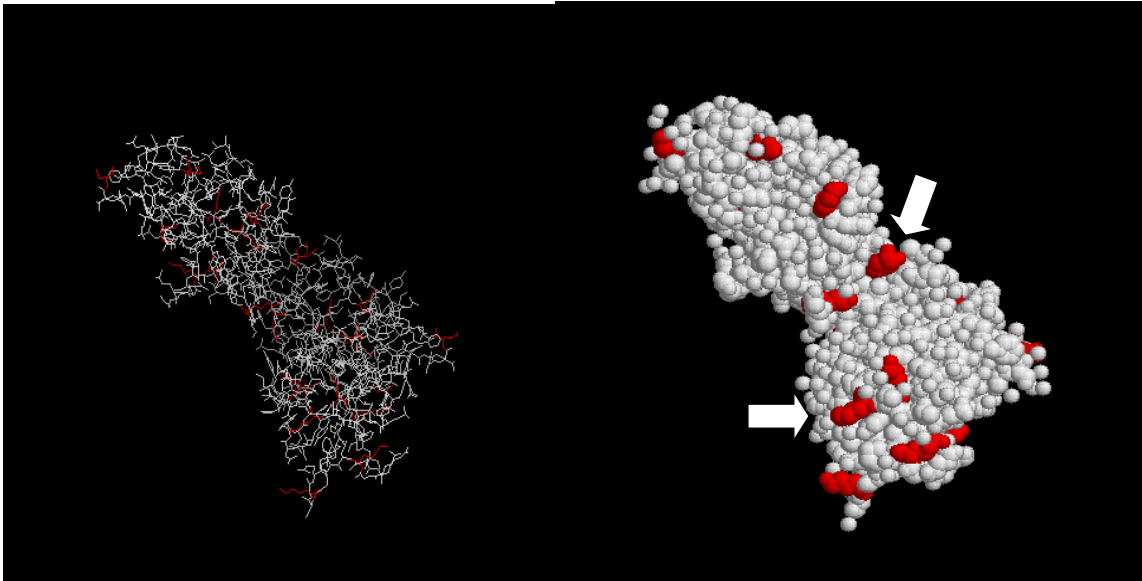


Abb. 21: Röntgenstrukturanalyse der Ribonuclease

Dargestellt sind in der linken Abbildungshälfte das "Stick-Modell" eines Dimers der Ribonuclease, rechts ist das entsprechende Kalottenmodell eines Dimers der Ribonuclease dargestellt. Die Arbeitsgruppe Wilchek fand in ihren Untersuchungen heraus, dass bei der Bromcyan vermittelten Kopplung von Ribonuclease an Sepharose nur zwei von acht Lysine an die Sepharose gebunden werden. Die Lysine der Ribonuclease sind rot markiert. Die an der Kopplung teilnehmenden Lysine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Informationen bezüglich der Röntgenstrukturanalyse entstammen Mauguen (Mauguen et al. 1982).

Die folgenden Untersuchungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms: "Protein deep viewer" durchgeführt (Guex und Peitsch 1997). Hierzu sei auf die Beschreibung dieses Programmes in 2.4.8 verwiesen

3.5.1 Verwendung von Netto-Energiepotentiale zur Kopplungsvorhersage

Ein Unterprogramm des „Protein deep viewer“, das "GROMOS"-Programm (Gunsteren 1996), berechnet die Energiepotentiale einzelner Aminosäuren auf Grundlage der „Mean Force Potentiale“. Es werden kurz die diesem Programm zu Grunde liegenden Annahmen erläutert (Sippl 1990).

Die Position eines Atoms kann in einem Protein durch ein kartesisches System beschrieben werden. Das Atom x_i , das einer Aminosäure i zugehörig ist, wird mit x_i bezeichnet. Der Abstand d zwischen den Atomen x_i und x_j zweier verschiedener Aminosäuren i und j wird mit d_{ij} (x) abgekürzt dargestellt. Aufbauend auf den Abständen d_{ij} (x) kann die Diagonale k zwischen zwei Aminosäuren berechnet werden.

Da ein Molekül kein starres System ist, kann die Distanz d zwischen zwei Atomen in einem bestimmten Intervall s differieren. Jede Distanz zwischen zwei C-Atomen tritt mit einem bestimmten Wahrscheinlichkeitswert auf, der durch die Funktion $f(s)$ beschrieben werden kann.

Es ist somit $f(s)$ eine Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion ("density probability"; Sippl 1990) im Intervall s . Aus der Funktion $f(s)$ kann auf Grundlage des Boltzmann Gesetzes (Sippl 1990) wiederum das "Mean Force Potential" $E(s)$ errechnet werden (Gl. 6):

$$E(s) = -k T \ln (f(s)) - k T \ln (Z) \quad (\text{Gl. 6})$$

Hierbei ist k die Boltzmann Konstante und T die absolute Temperatur. Z ist die Boltzmann Summe, die jedoch aus dem Wahrscheinlichkeitswerten nicht berechnet werden kann. Sippl legte in seiner Arbeit dar, dass dieser Wert unter bestimmten Umständen als eine Konstante von den weiteren Berechnungen ausgenommen werden kann, ohne dass sich die Relation der Ergebnisse ändern würde (Sippl 1990).

Für jedes Aminosäurepaar a und b mit einer im Intervall s liegenden Diagonalen k (Index) kann auf Grundlage der Röntgenstrukturuntersuchungen die oben beschriebene Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $f_k^{ab}(s)$ berechnet werden (Schmidt et al. 1984 und Sippl 1990).

Das Energiepotential $E_k^{ab}(s)$ eines Aminosäurepaares kann auf Grundlage der obigen Gleichungen folgendermaßen berechnet werden. Z ist die bereits erwähnte Boltzmann Summe:

$$E_k^{ab}(s) = -kT \ln(f_k^{ab}(s)) - kT \ln(Z_k^{ab}) \quad (\text{Gl. 7})$$

In einem weiteren Schritt schlussfolgerte Sippl, dass die Netto-Energiepotential $\Delta E_k^{ab}(s)$ eines Aminosäurepaares a und b kalkuliert werden kann, indem vom $E_k^{ab}(s)$ die gemittelte Energie $E_k(s)$ des ganzen Proteins subtrahiert wird (s. Gl. 8):

$$\Delta E_k^{ab}(s) = E_k^{ab}(s) - E_k(s) \quad (\text{Gl. 8})$$

Ist nun wiederum $\Delta E_k^{ab}(s)$ bekannt, so können dann auch für längere Abschnitte des Proteins die Netto-Energiepotentiale bestimmt werden. Für ein Protein kann der Energiebeitrag ΔE einer bestimmten Sequenz S_q der Länge L und der Konformation C_p aus folgenden Variablen berechnet werden:

An den Positionen i und j befinden sich Aminosäuren a und b . Sind nun die kartesische Positionen x der Konfiguration C_q zwischen diesen beiden Aminosäuren bekannt, kann aus den

sich ergebenden Distanzen d zwischen jeweiligen Atomen der Aminosäuren a und b die Diagonale k (Index) zwischen diesen Aminosäuren berechnet werden. Auf Grundlage dieser Entfernung k (Index) kann wiederum das Netto-Energiepotential $\Delta E_k^{ab}(s)$ ($d_{i,j}(x)$) theoretisch vorher-gesagt werden.

In einem letzten Schritt wird über die gesamte Länge L dieser Sequenz die Summe der Energiepotentiale $\sum_{i=1}^L$ und $\sum_{j=i+1}^L$ der jeweils benachbarten Aminosäurenpaare i und j ($j=i+1$) gebildet und so der Netto-Energiepotentialbeitrag $\Delta E(x)$ berechnet. Zusammengefasst lässt sich das Netto-Energiepotential einer bestimmten Sequenz S_q mit der Konformation C_p ($=\Delta E(S_q, C_p)$) durch die in Gl. 9 dargestellte Formel berechnen:

$$\Delta E(S_q C_p) = \Delta E(x) = \sum_{i=1}^L \sum_{j=i+1}^L \Delta E_k^{ab}(d_{i,j}(x)) \quad (\text{Gl. 9})$$

Aus der Verknüpfung des Ortes der Aminosäuren und den einwirkenden Kräften wird das Netto-Energiepotential für eine bestimmte Sequenz berechnet. Je positiver die resultierende Energie ist, desto instabiler ist die Konformation des Proteins. Ein Protein strebt im Verlauf der Faltung zur größt möglicher energetischer Stabilität und wird daher energetisch instabile Konformationen seltener einnehmen (Gunsteren 1996). Das Netto-Energiepotential ΔE_l einer bestimmten Sequenz können im Falle der Ribonuclease und des Calmodulins auf Grundlage der Röntgenstrukturanalyse und der sich ergebenden Diagonalen k (Index) berechnet werden. Hierbei ist ΔE_l die konkrete Form für $\Delta E(x)$. Werden nun einzelne Aminosäuren modifiziert, kann das Programm ein neues Netto-Energiepotential ΔE_2 an dieser modifizierten Aminosäurestelle berechnen.

Durch Bezugnahme auf Gl. 8 kann die Änderung der Netto-Energiepotentiale $\Delta E_{2,l}$ an dieser Stelle berechnet werden (s. Gl. 10):

$$\Delta E_{2,l} = \Delta E_2 - \Delta E_l \quad (\text{Gl. 10})$$

Ist nun $\Delta E_{2,l}$ vom Vorzeichen her positiv, so bedeutet dies, dass zusätzliche Energie für das Erreichen dieser Konfiguration aufgewendet werden muss, vice versa gilt das entsprechende bei einem negativen Vorzeichen (Guex und Peitsch 1997).

Die Bindung eines der Lysinseitenketten der Ribonuclease sowie des Calmodulins an die Sepharose verändert die Struktur der einwirkenden Kräfte an dieser Lysinstelle und bewirkt eine Änderung des Netto-Energiepotentials der jeweiligen Lysine. Nimmt das Netto-

Energiepotential an dieser Stelle zu ($\Delta E_{2,1}$ ist positiv), so wird durch diese neue Bindung die Konformation des Proteins an dieser Lysinposition instabiler werden, folglich wird diese Konformation seltener eingenommen und daher wird auch diese Kopplung seltener ablaufen (Gunsteren 1996).

Zur Berechnung der Netto-Energiepotentiale wurde im Falle des DVS-Calmodulins die in Gl. 5 Kapitel 3.1.1 verwendete Reaktionsgleichung benutzt, da diese den Vorgang der Kopplung des Calmodulins an die Sepharose beschreibt. In Anlehnung dazu wurde für das Beispiel der Ribonuclease die in Abb. 20 angegebene Reaktionsgleichung herangezogen.

Es wurde die Netto-Energiepotentiale der einzelnen Lysine vor und nach Bindung an die Sepharose berechnet. Einschränkend ist zu sagen, dass die energetischen Betrachtungen auf Annahmen im Vakuum beruhen und nicht ganz die Gegebenheiten im Kontakt mit Wasser und NaCl widerspiegeln.

Tabelle 11 und 12 verdeutlichen die theoretischen energetischen Veränderungen vor und nach der Kopplung des Calmodulins an die Sepharose.

Tab. 11: **Eigenschaften der Lysinseitenketten des Calmodulins**

Seiten- gruppe	Netto- Energiepo- tential des Lysins vor der Kopplung in kJ/mol ΔE_1	Netto- Energie- potential des Lysins nach Kopplung an die Sepharose in kJ/mol ΔE_2	Differenz der Netto- energie- potentiale $\Delta E_{2,1} =$ $\Delta E_2 - \Delta E_1$ in kJ/mol	Anzahl der basischen Amino- säuren im Umkreis von 5 Å	Anzahl der sauren Amino- säuren im Umkreis von 5 Å	Anzahl der hydropho- ben Amino- säuren im Umkreis von 5 Å	Anzahl der polaren Amino- säuren im Umkreis von 5 Å
Lys 13	-12	-4	8	0	2	6	0
Lys 21	16	6	-10	0	3	4	0
Lys 30	25	-10	-35	0	1	3	2
Lys 75	8	3	-5	1	1	4	1
Lys 77	53	-8	-61	1	2	2	2
Lys 94	20	-3	-23	1	2	4	1
Lys 115	10	5	-5	0	1	3	1

Dargestellt sind die Netto-Energiepotentiale der einzelnen Lysine des Calmodulins vor und nach Kopplung an die Sepharose. Weiterhin sind die Eigenschaft der umgebenden Aminosäuren (hinsichtlich Azidophilie, Basophilie, Hydrophilie) dieser Lysine aufgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem „GROMOS“-Programm berechnet (Gunsteren 1996). Dieses Programm verwendet wiederum die in Gleichung 9 verwendete Formel von Sippl (Sippl 1990) und weiterhin die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse des Calmodulins.

Tab. 12: **Eigenschaften der Lysine der Ribonuclease**

Position	Netto-Energie-potential des Lysins vor der Kopplung in kJ/mol ΔE_1	Netto-Energie-potential des Lysins nach Kopplung an die Sepharose kJ/mol ΔE_2	Differenz der Netto-Energie-potentiale $\Delta E_{2,1} = \Delta E_2 - \Delta E_1$ in kJ/mol	Anzahl der basischen Aminosäuren im Umkreis von 5. Å	Anzahl der sauren Aminosäuren im Umkreis von 5 Å	Anzahl der hydrophoben Aminosäuren im Umkreis von 5 Å	Anzahl der hydrophilen Aminosäuren im Umkreis von 5 Å
Lys 19	0.3	-2	-2,3	1	0	1	2
Lys 27	39	5	-34	0	1	2	1
Lys 39	45	-5	-50	2	0	1	2
Lys 49	21	-15	-36	1	1	0	1
Lys 62	51	-3	-54	1	1	1	1
Lys 66	-20	15	35	0	1	2	1
Lys 98	7	-5	-12	1	1	0	2
Lys 108	-11	-18	-7	0	1	0	1

Dargestellt sind die Netto-Energiepotentiale der einzelnen Lysine der Ribonuclease vor und nach Kopplung der Lysinseitenkette an die Sepharose. Weiterhin sind die Eigenschaften der umgebenden Aminosäuren (hinsichtlich Azidophilie, Basophilie, Hydrophilie) dieser Lysine verzeichnet. Die Ergebnisse wurden mit dem „GROMOS“-Programm berechnet (Gunsteren 1996). Dieses Programm hat wiederum die in Gl. 9 verwendete Formel von Sippl (Sippl 1990) zur Grundlage. Weiterhin zieht das Programm die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse der Ribonuclease hinzu.

Im Falle des Calmodulins (Tabelle 11) wiesen alle Lysine, mit Ausnahme des Lys 13, eine Abnahme der Netto-Energiepotentiale nach Bindung an die Sepharose auf.

Lys 13 hingegen wies eine Zunahme der Netto-Energiepotentiale von 8 kJ/mol nach Bindung an die Sepharose auf. Lysin 30 und 77 weisen die größte Differenz bezüglich des Netto-Energiepotentials auf (-35 kJ/mol und -61 kJ/mol). Daher würde man vom energetischen Aspekt erwarten, dass diese beide Lysine an die Sepharose gekoppelt werden. Diese Frage könnte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, könnte auch die Mehrzahl der Lysine der Ribonuclease (mit Ausnahme Lys 66) von nettoenergetischem Aspekt an der Kopplung teilnehmen, da theoretisch bei all diesen Lysinseitenketten eine Abnahme der Netto-Energiepotentiale nach der Kopplung stattfindet. Nicht nur die zwei an der Kopplung teilnehmenden Lysine 19 und 98 weisen eine Abnahme der Netto-Energiepotentiale von -2,3 kJ/mol im Falle des Lys. 19 sowie von -12 kJ/mol im Falle des Lys. 98 auf, sondern auch für die anderen Lysine ist eine Abnahme der potentiellen Energie charakteristisch. Nur bei Lys. 66 ist eine Zunahme der Netto-Energiepotentiale von 35 kJ/mol zu verzeichnen. Vom Betrag her resultiert aber bei den

Lys. 39 und Lys. 62 die größte Differenz hinsichtlich des Netto-Energiepotentials. Man würde jetzt also erwarten, dass diese Lysine an die Sepharose gebunden werden, was aber nicht der Fall ist. Ergo ist dieses Modell auf die Ribonuclease nicht anwendbar und lässt sich daher nicht auf Calmodulin übertragen.

Weiterhin sind die an der Kopplung teilnehmenden Lys 19 und Lys 98 der Ribonuclease nicht von mehr acidophilen, oder basophilen, oder hydrophoben bzw hydrophilen Aminosäuren umgeben als die anderen Lysine. Zum Beispiel ist Lys 19 in einem Umkreis von 5 Å von einer basischen Aminosäure umgeben, dies trifft aber auch auf Lys 49 und 62 zu. Ähnliche Ergebnisse ergeben sich auch für umgebenden acidophilen, hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren. Erwähnenswert ist aber, dass Lys 19 und 98 von der gleichen Anzahl sauren und hydrophilen Aminosäuren umgebend sind.

Die in Tabelle 12 für Ribonuclease festgestellten Beobachtungen sind in ähnlicher Weise auf Calmodulin anwendbar (Tabelle 11).

Zum Beispiel ist Lys 21 im Umkreis von 5 Å von vier hydrophoben Aminosäuren umgeben, dies traf aber auch auf Lys 75 und Lys 94 zu.

3.5.2 Zugänglichkeit der Lysine des Calmodulins und der Ribonuclease

Neben den oben beschriebenen energetischen Betrachtungen wurde im Folgendem die Reaktionskinetiken der Kopplungsvorgänge näher analysiert.

Die Reaktionskinetik wird allgemein durch die Arrhenius-Gleichung (Castellan 1971) beschrieben.

$$k = PZe^{\Delta G/RT} \quad (\text{Gl. 11})$$

Wobei P die Wahrscheinlichkeit eines Stoßes, Z die Stoßzahl und G die Aktivierungsenthalpie darstellen. Aus der Kombination dieser Faktoren ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante k einer jeweiligen Reaktion.

Würde ein oder zwei Lysine im Vergleich zu den anderen Lysinen einen vom Betrag her grossen Wert für k aufweisen, so würden diese Reaktionen schneller und somit auch bevorzugter ablaufen. Die Wahrscheinlichkeit P eines erfolgreichen Stoßes hängt auch von der Zugänglichkeit ab.

Zugänglichkeit wird in diesem Zusammenhang definiert als ein Maß dafür, welcher Anteil der Oberfläche der Orbitalelektronen einer bestimmten Aminosäure X frei zugänglich ist. Die Zugänglichkeit kann durch benachbarte Aminosäuren begrenzt werden (z.B. durch deren

Größe, Ladung oder räumliche Anordnung). Als Vergleichsgröße wird die Zugänglichkeit derselben Aminosäure X in einem linearen Pentapeptid GGXGG hinzugezogen. Ein Wert von 1 für die Aminosäure X_1 im jeweiligen Protein Y bedeutet, dass Zugänglichkeit für X_1 im Protein Y genauso groß ist, wie die von X_1 im Pentapeptid GGX₁GG. Im Falle der Ribonuclease (Tabelle 13) variierte die Zugänglichkeit der Lysine in einem Bereich zwischen 0,3 und 0,6. Die Zugänglichkeit der Lysine 1 und 8 der Ribonuclease (diese werden an die Sepharose gekoppelt) ist mit jeweils 0,5 nicht größer als die Zugänglichkeit der Lysine 5 und 6. Somit kann im Falle der Ribonuclease die Zugänglichkeit nicht allein die Bevorzugung dieser beiden Lysine erklären. Ähnliches gilt für Calmodulin; die Zugänglichkeitswerte variieren hier noch weniger (zwischen 0,5 und 0,65).

Auf jeden Fall haben die Lysine der Ribonuclease mit dem größten Wert für $\Delta E_{2,1}$ (Lys 39 und Lys 62) auch eine Zugänglichkeit von 0,5. Ebenso lässt sich diese Beobachtung auch bei Calmodulin nachvollziehen. Auch hier weisen die Lysine mit einem großen $\Delta E_{2,1}$ (Lys 30 und 77) Zugänglichkeitswerte von 0,5 und nicht z.B. von 0,2 auf.

Tab. 13: **Zugänglichkeit der einzelnen Lysine des Calmodulins und der Ribonuclease**

Calmo- dulin	Lysin	13	21	30	75	77	94	115	
	Zu- gäng- lichkeit	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,55	0,65	
Ribonuc- lease	Lysin	19	27	39	44	62	66	98	108
	Zu- gäng- lichkeit	0,5	0,3	0,6	0,2	0,5	0,5	0,3	0,5

Das Maß der Zugänglichkeit wurde mit Hilfe des Programmes „Protein deep viewer“ berechnet. Zum genauen Algorithmus und Quellverweis siehe 2.4.8. Kurz gesagt wird die Zugänglichkeit der Lysine mit der Zugänglichkeit des linearisierten Pentapeptids GGXGG verglichen (diese hat eine normierte Zugänglichkeit von 1). Die Nummerierung der einzelnen Lysine bezieht sich auf die Aminosäureposition bezogen auf den N-Terminus.

Neben der Zugänglichkeit beeinflusst die Aktivierungsenthalpie E_a die Geschwindigkeitskonstante k . Bei vom Betrag her gleichem Wert für die Zugänglichkeit der Lysine könnte eine unterschiedliche Aktivierungsenergie erklären, weshalb nur zwei Lysine an die Sepharose gekoppelt werden. Aufbauend auf diese Hypothese würden im Falle der Ribonuclease nur die beiden Lysinseitenketten an der Kopplung teilnehmen, die die kleinste Aktivierungsenergie aufweisen. Ähnliche Modelle könnten auch für Calmodulin zutreffen. Mit den zu Verfügung stehenden bioinformatischen Mitteln ist jedoch die Berechnung der Aktivierungsenthalpie

nicht möglich. Abschließend lässt sich wie folgt zusammenfassen: Die bioinformatischen Methoden sind ein Mittel, die Vorgänge der ungerichteten Immobilisierung besser verstehen und vorhersagen zu können.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Orientierte versus nicht orientierte Proteinadsorption

Die unterschiedlichen affinitätschromatographischen Eigenschaften der orientierten und nicht orientierten Proteinimmobilisierung wurden als ein zentraler Gegenstand dieser Dissertation untersucht.

Die Arbeitshypothese war, dass die orientierte Proteinimmobilisation (in diesem Falle GST-Calmodulin-Sepharose) verglichen mit der nicht-orientierten Immobilisation (in diesem Fall DVS-Calmodulin-Sepharose) eine Verbesserung der Affinitätschromatographie der uCaM Syn-F2 hinsichtlich Aufreinigung und Ausbeute erbringen sollte. Die Ausgangsüberlegungen für diese Hypothese wurden in 3.1 dargestellt.

Die durchgeführten Experimente führten zu folgenden Ergebnissen:

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, ergab sich für die orientierte Immobilisierung eine Anreicherung für uCaM Syn-F2 von 7,5-fach sowie eine spezifische Aktivität von 7,5 pkat/mg. Ähnliche Resultate ergaben sich für die Anreicherung von uCaM Syn-F2 auf nicht orientiert immobilisiertem Calmodulin: die Anreicherung betrug 10,7-fach und die erzielte spezifische Aktivität 10,9 pkat/mg. Auf GST-Calmodulin-Sepharose konnte im Eluat 78 % der eingesetzten uCaM Syn-F2 Aktivität wiedergefunden werden, der entsprechende Wert für DVS-Calmodulin-Sepharose war 40 %. Ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den beiden Immobilisationsarten konnten für die Ausbeute festgestellt und ein tendenziell doppelt so hoher Wert für die Bindungskapazität verzeichnet werden, dies wiederum widersprach den zu Beginn geäußerten theoretischen Vorüberlegungen (s. 3.1.1).

Parallel zu diesen Ergebnissen erschien eine Publikation der Arbeitsgruppe Wilchek (Wilchek und Miron 2003) zur Bromcyan vermittelten ungerichteten Immobilisierung. Wilchek wies bei der Ribonuclease nach, dass die Kopplung nur über die Aminogruppe der Lysinseitenkette zweier Lysine (Lys 19 und 98) stattfand, obwohl die Ribonuclease acht verschiedenen Lysine aufweist. Es konnten somit statt der theoretisch möglichen acht Orientierungen nur zwei gefunden werden, es ergab sich somit eine eingeschränkte Zahl von Orientierungen.

Würde in Analogieschluss beim ungerichtet immobilisiertem Calmodulin ebenso nur eine eingeschränkte Zahl an Orientierungen tatsächlich vorkommen und würden diese

Orientierungen wiederum die Bindung von uCaM Syn-F2 an Calmodulin sterisch nicht behindern, so wären die affinitätschromatographischen Ergebnisse der ungerichteten Immobilisierung mit den Ergebnissen der gerichteten Immobilisierung vergleichbar.

Somit wäre die neue Hypothese, dass Calmodulin nur über zwei Lysine an die Sepharose gebunden wird. Würde von diesen beiden Lysinen nur eines der Lysine eine sterisch Orientierung ermöglichen, die eine Interaktion mit calmodulinbindenden Proteinen erlaubt, so würde diese Tatsache den um Faktor 2 großen Unterschied zwischen gerichtet und nicht gerichtet immobilisiert erklären.

Auf bioinformatischer Basis wurde untersucht, ob es Erklärungsansätze für die eingeschränkte Zahl von Kopplungen der Ribonuclease gibt. In einem weiteren Schritt wurde die Übertragbarkeit dieser Modelle auf Calmodulin überprüft. In einem ersten Ansatz wurde der Aspekt der Zugänglichkeit der verschiedenen Lysinseitengruppen betrachtet (s.a. 3.5.2). Hierbei ergaben die Untersuchungen, dass sich die Zugänglichkeit der beiden an der Kopplung teilnehmenden Lysinseitengruppen der Ribonuclease nicht wesentlich von anderen Lysinen der Ribonuclease unterscheiden (Tabelle 13). Auch wurde untersucht, ob die an der Kopplung teilnehmenden Lysine der Ribonuclease von einer größeren Zahl hydrophiler, hydrophober, basischer oder azidophiler Aminosäuren umgeben wären. Es zeigten sich auch in diesem Falle keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 12). Ähnliche Ergebnisse wären sich im Falle des Calmodulins zu beobachten (Tab. 11 und 13).

Weitere Erklärungsansätze für die Bevorzugung einzelner Lysine könnten die Netto-Energiepotentiale bieten. Mit dem Programm GROMOS ist es möglich, die Netto-Energiepotentiale der einzelnen Aminosäuren zu berechnen. Würde die Netto-Energiepotentiale einer Lysinseitengruppe nach Kopplung an die Sepharose zunehmen, ergäbe sich eine energetisch ungünstigere „Konformation“ des Proteins an dieser Stelle. Eine solche Kopplung würde aus energetischen Gründen seltener ablaufen. Von den untersuchten Lysinen der Ribonuclease sowie des Calmodulins wiesen mit Ausnahme von jeweils einem Lysin alle weiteren Lysine eine Abnahme der Netto-Energiepotentiale nach Bindung an die Sepharose auf. Vom energetischen Aspekt wären somit fast alle Orientierungen möglich (Tab. 11). Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tab. 11 und 12 Kapitel 3.5.1 wiedergegeben.

Unterschiedliche Aktivierungsenergien der Lysinseitenketten könnten einen neuartigen Erklärungsansatz bieten. Sollte die Aktivierungsenergie einzelner Lysinseitenketten deutlich kleiner sein als die der anderen Lysinseitenketten, so würde diese Lysinseitenkette

schneller (Geschwindigkeitskonstante k , siehe Gl. 11) mit der Agarose reagieren als die anderen Lysinseitenketten und somit bevorzugt an der Kopplung teilnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bioinformatische Methode ein Mittel darstellen könnte, die Abläufe der ungerichteten Immobilisation zu verstehen und vorherzusagen. Die zu Zeit vorhandene Modelle (Sippl) sind aber noch zu ungenau, um Verwendung finden zu können. Dass jedoch eine gerichtete Immobilisation auf Grund sterischer Gegebenheiten Vorteile bieten könnte, zeigten folgende Publikationen.

In einem Lipidmonolayer-System auf einer planen Goldoberfläche immobilisierte die Arbeitsgruppe Luk Ribonuclease (Luk et al. 2002). Es wurde dabei die Ribonuclease an Position 19 modifiziert und Alanin in Cystein (A19C) verwandelt. In einem zweiten Schritt wurde die Goldoberfläche, an die die Ribonuclease gerichtet immobilisiert wurde, mit 2-Aminoethanethiol behandelt, so dass auf dieser Oberfläche Thiol-Gruppen entstanden. An diese Thiol-Gruppen wurde wiederum die A19C modifizierte Ribonuclease gebunden. Im Falle der ungerichteten Immobilisierung wurde die Ribonuclease über die Aminogruppen der Seitenkette der Lysine oder über den N-Terminus des Proteins an die Oberfläche gebunden. Als Ergebnis hielt Luk fest, dass orientiert immobilisierte Ribonuclease eine vierfach höhere Bindungskapazität für die Bindung von Ribonuclease-Inhibitor A aufweist als nicht orientiert immobilisierte Ribonuclease. Anzumerken ist, dass trotz einer verhältnismäßig aufwendigen Immobilisierungsprozedur auf einer sehr homogenen Oberfläche die Bindungskapazität nur um Faktor vier gesteigert werden konnte. Zumal die so orientierte Ribonuclease nicht für eine Affinitätschromatographie eingesetzt werden kann, da die so erhaltene Ribonuclease-Gold-Oberfläche sehr fragil ist (s. oben zitierte Publikation). Der Steigerungsfaktor vier ist angesichts des großen Aufwandes nicht viel größer als die Steigerung der Bindungskapazität im Falle des GST-Calmodulins.

Thess verwendete rekombinant synthetisiertes 20 S Proteasom, das an verschiedenen Positionen seiner einzelnen Untereinheiten His-getagged war. Dieses 20 S-Proteasom wurde orientiert über den His-Tag der einzelnen Untereinheiten immobilisiert. Anschließend wurde die proteolytische Aktivität der so immobilisierten Proteasome gemessen. Je nach Immobilisierungsposition ergaben sich unterschiedliche proteolytische Aktivitäten. Dies wurde als Ergebnis unterschiedlicher sterischer Hemmung der Interaktion des Proteasoms und des Substrats gewertet. Eine ähnliche Vorgehensweise wählte auch Allard (Allard et al. 2004). Er immobilisierte das p24-Protein des HIV-Virus über verschiedene His-Tag-Positionen und zeigte, dass je nach verwendeter His-tag-Position sich die Antigenität des Proteins veränderten. Die Antigenität wurde als Maß dessen gemessen, wieviele

verschiedene Antikörper das p-24 erkennen und binden können. In den genannten Fällen wurden aber die immobilisierten Proteine nicht zur Affinitätschromatographie eingesetzt. Dies stellte den neuen Ansatz dieser Dissertation dar.

Dass jedoch ähnlich dem Beispiel des Calmodulins die orientierte Immobilisierung nicht immer Vorteile bietet, zeigte Vankova (Vankova et al. 1998). Sie immobilisierte Anti-körper gerichtet und ungerichtet. Die gerichtete Immobilisierung erfolgte über die Kohlenhydratgruppe der Fc-Region der Antikörper an das Gel. Bei der ungerichteten Immobilisierung werden die Antikörper an ein antikörperbindendes Gel in verschiedenen Positionen immobilisiert. Nach Messung der Bindungskapazität dieser Antikörper zur Bindung von spezifischen Zytokinen konnte Vankova keinen Unterschied zwischen orientiert und nicht orientiert immobilisierten Antikörpern feststellen. Sie schlussfolgerte, dass auch bei der ungerichteten Immobilisierung für die Antikörper genügend räumliche Freiheitsgrade bestehen, die eine Interaktion mit dem Antigen ermöglichen.

Ob nun die orientierte Immobilisation im Anwendungsbeispiel der Affinitäts-chromatographie eine höhere Anreicherung oder eine größere Bindungskapazität aufweist, lässt sich nicht a priori festlegen. Dies hängt, wie die hier gezeigten Beispiele demonstrieren, viel mehr von der Immobilisationsart sowie dem jeweiligen Protein ab. Verbesserte bioinformatische Methoden, als sie hier verwendet wurden, könnten jedoch Vorhersagemodelle bieten, um rechnergestützt zielgerichtete Verfahren für Affinitätsgele zu entwickeln.

4.2 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die biochemischen Eigenschaften der uCaM Syn-F2

Eine Beobachtung im Zuge der Aufreinigung der uCaM Syn-F2 war, dass die biochemischen Eigenschaften der uCaM Syn-F2 je nach Lagerungszeit und Lagerungsbedingung variierten. Wie schon bereits unter 3.2 erwähnt, wurden bei diesen Präparationen drei verschiedene Pools verwendet. Die Pools 1 und 2 stellten langzeitgelagerte Pools (zwischen fünf und sechs Jahre) dar. Beide Pools wurden ohne zusätzliche Proteaseinhibitoren eingefroren (mit Ausnahme von Leupeptin). Die weitere Aufreinigung dieser beiden Pools mittels MonoQ-Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationen lieferten folgende Ergebnisse:

Pool 1, der für sechs Jahre in Abwesenheit von Calcium bei -80°C gelagert wurde, wies in der Anionenaustauschchromatographie Maxima im Bereich 210, 290 mM und 380 mM KCl auf.

Pool 2 (Lagerungszeit fünf Jahre bei -80°C , Lagerung in Gegenwart von Calcium) wies in der Anionenaustauschchromatographie Aktivitätsmaxima im Bereich von 200 und 300 mM KCl auf. Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse erbrachte die Gelfiltration dieser beiden Pools. Sowohl für Pool 1 als auch für Pool 2 konnten höhermolekulare Proben im Bereich von 1,6 MDa nachgewiesen werden (s. Abb. 14 Kapitel 3.3).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde ein dritter Pool (U-Seph-D Pool 3) verwendet, dem beim Einfrieren Proteasehemmer zugefügt wurde. Zusätzlich wurden die Proben in Abwesenheit von Calcium gelagert. Bei der anionenaustauschchromatographischen Aufarbeitung dieses Calmodulin-Sepharose-Eluat Pools 3 fand sich nur ein Elutionspeak bei 410 mM KCl. In der anschließenden Gelfiltration war nur ein einzelner Aktivitätspeak bei ca. 437 kDa zu beobachten.

Durch Vorgänge beim Einfrieren und Auftauen sind die Proteine Konformationsveränderungen unterworfen (Carpenter et al. 1999) und sind somit in dieser Phase proteolytischen Veränderungen besonders zugänglich. Durch eine limitierte Proteolyse können Proteine zu größeren Einheiten aggregieren (Carpenter et al. 1999). Dies ist ein Erklärungsansatz für das Vorkommen höhermolekularer Komplexe in der Gelfiltration der Pools 1 und 2. Durch das Hinzufügen von Proteasehemmer können diese Einflüsse minimiert werden, so dass im Falle des Pools 3 nur noch ein Aktivitätspeak in der Gelfiltration nachweisbar ist. Weiterhin können durch Calcium zusätzliche Proteasen wie z.B. Calpain aktiviert werden (Kim 2002). Diese Tatsache wurde erklären, weshalb bei Pool 2 (mit Calcium) kein Aktivitätspeak bei 370-390 mM KCl zu beobachten ist (Abb. 11B), jedoch ein solcher Peak bei Pool 1 und 3 (ohne Calcium) nachweisbar ist (Abb. 11A). Würde dieser Aktivitätspeak im Bereich von 370-390 mM das native Enzym darstellen, so könnte uCaM Syn-F2 durch zusätzliche Aktivierung von Calcium abhängigen Proteasen proteolytisch noch in einem stärkeren Maße verändert werden. Es wären dann nur noch Fragmente der uCaM-SynF2 als Aktivitätspeaks im Bereich von 200-300 mM KCl feststellbar.

Insgesamt wird durch proteolytische Einflüsse die Affinität der uCaM Syn-F2 zur MonoQ-Säule erniedrigt, so dass uCaM Syn-F2-Fragmente schon bei niedrigerem KCl-Gehalt eluiert werden. Ähnliche systematische Untersuchungen bezüglich der Veränderung biochemischer Eigenschaften von Proteinen während des Einfrierens und Auftauens

wurden zum Beispiel in der Nahrungsmittelforschung durchgeführt. Die Arbeitsgruppe Careche (Careche et al. 1999) führte Untersuchung über die Veränderung von Muskelfibrillen bestimmter Fischarten während der Einfrierens durch. Er stellte fest, dass sich die Zahl der β -Faltblattstrukturen dieser Fibrillen zu Ungunsten der α -Helices erhöht.

Dass nicht nur der Vorgang des Einfrierens und Auftauens, sondern auch die Lagerungszeit selbst die Struktur von Proteinen verändern kann, zeigte die Arbeitsgruppe Mazo (del Mazo et al. 1999). Dieser wies nach, dass aufgereinigtes Actinomyosin während der Gefrierlagerung bei -70°C zu größeren Einheiten aggregiert und dass der Anteil dieser Aggregate mit der Lagerungszeit zunimmt. Weiterhin nimmt parallel mit der Lagerungszeit die Zahl der Schwefel-Brücken-Bindungen des Actinomyosins ab. Aufbauend auf diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassend feststellen, dass durch Langzeitlagerung, Einfrieren und Auftauen sowie Anwesenheit von Calcium die biochemischen Eigenschaften der uCaM Syn-F2 als Ergebnis proteolytischer Einflüsse verändert werden können.

4.3 Nachweis der Calmodulin-bindenden Untereinheit durch Overlay

Die Funktion des uCaM Syn-F2 besteht darin, Calmodulin zu binden und dieses auf Ubiquitin zu übertragen. Durch ein Calmodulin-Overlay sollte es somit möglich sein, die calmodulinbindende Untereinheit zu identifizieren. Als Positivkontrolle der jeweiligen Overlays wurde Calcineurin und die γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase verwendet (bezüglich der Gründe für die Wahl dieser Proteine siehe 3.4). Die Overlays wurden zunächst in Analogie zu der von Berchtold durchgeführten Overlays durchgeführt. Es gelang der Nachweis des calmodulinbindenden Proteins Calcineurin.

Mit den in der Literatur beschriebenen Methoden gelang es jedoch nicht die γ -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase sowie die calmodulinbindende Komponente der uCaM Syn-F2 nachzuweisen. Durch die Overlay-Prozeduren könnten die Tertiärstrukturen der uCaM Syn-F2 und der γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase so weit verändert werden, dass sie Calmodulin nicht mehr binden. Daher wurden einige Punkte des Overlayverfahrens modifiziert. Unter anderem wurde die Proben nur auf 55°C erhitzt, die Overlays wurden nach der Inkubation keinen Waschungsschritten unterzogen, die Harnstoff und Guanidiniumchlorid enthalten. All diese Modifikationen beinhalten aber auch die Möglichkeit, dass die unspezifische Adsorption des Calmodulins an die Blott-Membran zunimmt. Mit diesen Modifikationen gelang es die γ -Untereinheit der Phosphorylase

Kinase nachzuweisen. Jedoch kam weiterhin die calmodulinbindende Komponente der uCaM Syn-F2 nicht zur Darstellung. Daher wurde an Stelle des standardmäßig verwendeten Milchproteins bovines Serumalbumin (BSA) als Blockierprotein benutzt, um die unspezifische Bindung des Calmodulins an die Blotmembran zu verhindern. Mit dieser weiteren Modifikation gelang in den einzelnen Präparationsstufe der uCaM Syn-F2 die Identifikation verschiedener Banden. Mit zunehmender Anreicherung der uCaM Syn-F 2 in den jeweiligen Aufreinigungsstufen nahm die Zahl der nachzuweisenden Banden ab. Jedoch war eine Bande, die im Bereich von 30 kDa. lokalisiert war, stets in allen Reinigungsstufen nachweisbar.

Weiterhin waren aber auch in den Ansätzen, die in Abwesenheit von Calcium durchgeführt wurden, Banden nachweisbar (im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Berchtold, die in den Calcium freien Ansätzen keine Banden nachweisen konnte). Folgende Hypothese könnte diesen Sachverhalt erläutern: In Gegenwart von BSA wird die Konformation der calmodulinbindenden Proteine so konserviert, dass auch niederaffin calmodulinbindende Proteine von Calmodulin erkannt werden. Weshalb jedoch die Calciumabhängigkeit des Calmodulins verloren geht, ist unklar.

Als einer der ersten wies Andreasen (Andreasen et al. 1981) calmodulinbindende Proteine nach. Dazu verwendete er ^{125}I markiertes Azidocalmodulin. Nachteil dieser Methode jedoch war es, dass es nur wenige calmodulinbindende Proteine nachwies. Ähnlich den hier festgestellten Beobachtungen konnte auch er in den calciumfreien Ansätzen Banden nachweisen.

Andere Arbeitsgruppen verwendeten zum Nachweis von Calmodulin bindenden Proteinen nicht radioaktive Nachweismethoden. Unter anderem verwendete Murray (Murray et al. 2001) S-getaggttes Calmodulin. Die Arbeitsgruppe Yamakawa (Yamakawa et al. 2004) verwendete Alkalische Phosphatase markiertes Calmodulin. Bei beiden Methoden werden extensive Nachwaschungen mit starken Detergentien durchgeführt (unter anderem Guanidiniumhydrochlorid und Natriumnitrit). Bei beiden Versuchen ist der in Kapitel 3.4 beschriebene Calciumeffekt zu beobachten. Somit könnte der fehlende Calciumeffekt einerseits durch spezifische Eigenschaften des BSA bedingt oder Ausdruck der weniger extensiven Nachwaschprozeduren sein.

Als abschließendes Ergebnis lässt sich festhalten, dass durch die modifizierte Overlay-Prozedur zugleich niederaffin (uCaM Syn-F2) und hochaffin calmodulinbindende (wie die γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase) Proteine nachweisbar sind.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation gelang es eine zielgerichtete Immobilisierung des Calmodulins durch Verwendung des Glutathion-S-Transferase-Calmodulin-Fusionsproteins (GST-Calmodulin) zu erreichen. Das neue GST-Calmodulin-Gel wurde zur Aufreinigung von Ubiquitin-Calmodulin-Synthetase Faktor 2 (uCaM Syn-F2) eingesetzt. Dadurch konnte die Ausbeute um Faktor zwei gegenüber der bisher verwendeten Methode mit ungerichtet immobilisiertem Divinylsulfon-Calmodulin gesteigert werden. Von den Ausgangsüberlegungen her hätte dieser Faktor aber etwa sechs betragen müssen, da den sechs verschiedenen Lysinen des Calmodulins im Falle der Divinylsulfon-Kopplung nur ein N-Terminus im Falle der Immobilisierung des GST-Calmodulins gegenüber stand. Die Diskrepanz zwischen dem erwarteten Ergebnis und dem tatsächlich beobachteten Befund wurde so gedeutet, dass im Falle der ungerichteten Immobilisierung möglicherweise nur zwei Lysine des Calmodulins an der Kopplung teilnehmen. Von diesen sich ergebenden Orientierungen würde nur eine die Interaktion mit calmodulinbindenden Proteinen ermöglichen. Diese Vorstellung wiederum erklärt das ähnliche Verhalten im Vergleich zur streng orientierten Immobilisierung des Fusionsproteins am N-Terminus. Auf der Basis bioinformatischer Untersuchungen wurden verschiedene Modellvorstellungen, wie z.B. Force-Field und Zugänglichkeit, überprüft um so die Bevorzugung bestimmter Lysine zu erklären. Als Anwendungsbeispiel diente hierbei die Ribonuclease, von der bekannt war, dass sie nur über zwei Lysine an die Sepharose gebunden wird. Jedoch konnte keine Modellvorstellung die Bevorzugung einzelner Lysine erklären. Als abschließender Ansatz könnte die unterschiedliche Aktivierungsenergie der einzelnen Lysinseitengruppen eine Erklärung für die eingeschränkte Zahl reaktiver Lysine liefern. Die Aufreinigung der uCaM Syn-F2 an dem neuen Gel ergab, dass uCaM Syn-F2 durch proteolytische Einflüsse während des Lagerens in seinen biochemischen Eigenschaften (z.B. Molekulargewicht und Affinität zum Anionenaustauschergel MonoQ) verändert wurde. Die Proteolyse wurde durch die Anwesenheit von Calcium und der damit bedingten Aktivierung von Calpain verstärkt. Erst durch den Einsatz von Proteaseinhibitoren und kurzen Lagerungszeiten konnten die proteolytischen Einflüsse minimiert werden. Auf Grund hoher Verlusten bei der Anionenaustauschchromatographie wurde versucht, uCaM Syn-F2 durch die, in der Literatur beschriebenen, Blot-Overlay-Verfahren nachzuweisen. Diese Methoden ließen sich im Falle der uCaM Syn-F2 nicht reproduzieren, erst durch eine, in dieser Arbeit neue entwickelte, Overlay-Methode ließ sich eine 31 kDa große Bande als mögliche calmodulinbindende Komponente der uCaM Syn-F2 identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Akyol, Z., Bartos, J.A., Merrill, M.A., Faga, L.A., Jaren, O.R., Shea, M.A. & Hell, J.W.(2003):
Apo-calmodulin binds with its COOH-terminal domain to the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 C0 region.
J. Biol. Chem. 279, 2166-2175
- 2) Allard, L., Cheynet, V., Oriol, G., Gervasi, G., Imbert-Laurenceau, E., Mandrand, B., Delair, T. & Mallet, F. (2004):
Antigenicity of recombinant proteins after regioselective immobilization onto polyanhydride-based copolymers.
Bioconjug. Chem. 15, 458-466
- 3) Andreassen, T.J., Keller, C.H., LaPorte, D.C., Edelman, A.M. & Storm, D.R. (1981):
Preparation of azidocalmodulin: a photoaffinity label for calmodulin-binding proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 2782-2785
- 4) Arlot-Bonnemains, Y. & Prigent, C. (2002):
Cell cycle. A trigger for centrosome duplication.
Science 295, 455-456.
- 5) Babu, Y.S., Bugg, C.E. & Cook, W.J (1988):
Structure of Calmodulin, refined at 2.2 Å.
J. Mol. Biol. 204, 191-204
- 6) Bastians, H., Topper, L.M., Gorbsky, G.L. & Ruderman, J.V. (1998):
Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins.
Mol. Biol. Cell. 11, 3927-3941.
- 7) Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G. & Pagano, M. (2003):
Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation.
Cell 115, 71-82.
- 8) Bolton, A.E & Hunter, W.M. (1973):
The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent.
Biochem. J. 133, 529-539.
- 9) Bond, U. & Schlesinger, M. (1985):
Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts.
Mol. Cell. Biol. 5, 949-956
- 10) Careche, M., Herrero, A.M., Rodriguez-Casado, A., Del Mazo, M.L & Carmona, P. (1999):
Structural changes of hake (*Merluccius merluccius* L.) fillets: effects of freezing and frozen storage.
J. Agr. Food Chem. 47, 952-959.

- 11) Carpenter, J.F., Kendrick, B.S., Chang, B.S., Manning, M.C. & Randolph, T.W. (1999):
Inhibition of stress-induced aggregation of protein therapeutics.
Methods Enzymol. 309, 236-55
- 12) Castellan, G.W. (1971):
Physical Chemistry. 2. Ed.
Reading, Amsterdam, London, Singapur, Tokyo: Addison-Wesling Publishing Co.
- 13) Cenciarelli, C., Hou, D., Hsu, K.C., Rellahan, B.L., Wiest, D.L., Smith, H.T., Fried, V.A. & Weismann A.M. (1992):
Activitation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor.
Science 257, 795-797
- 14) Chafouleaus, J.G., Dedman, J.R., Munjaal, R.P. & Means, A.R. (1979):
Calmodulin.
J. Biol. Chem. 254, 10262-10267
- 15) Chang, T.L., Cubillos, F.F., Kakhiashvili, D.G. & Goodman, S.R. (2004)
Ankyrin is a target of spectrin's E2/E3 ubiquitin-conjugating/ligating activity.
Cell. Mol. Biol. 50, 59-66.
- 16) Cheung, W.Y. (1985):
Biological functions of Calmodulin.
The Harvey Lecture Series 79, 173-216
- 17) Ciechanover, A., Hod, Y. & Hershko, A. (1980):
A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic sytem from reticulocytes.
Bioch. Biophys. Res. Comm. 81, 1100-1105
- 18) Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. & Hershko, A. (1980):
ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for Protein breakdown.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1635-1368
- 19) Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. & Hershko, A. (1982):
“Covalent Affinity” purification of ubiquitin-activating enzyme.
J. Biol. Chem. 257, 2537-2542
- 20) Depaoli-Roach, A.A., Gibs, J.B. & Roach, P.J. (1979):
Calcium and calmodulin activation of muscle phosphorylase kinase.
FEBS Letters. 105, 321-324
- 20) Durner, J. & Börger, P. (1995):
Ubiquitin in the prokaryote *Anabaena variabilis*.
J. Biol. Chem. 270, 3720-3725
- 21) Fischer, R., Wei, Y. & Berchtold, M. (1996):
Research Reports

Biotechnol. Technique 21, 294-296

- 22) Freiberg, G., Mesecar, A.D., Huang, H., Hong, J.Y. & Liebman, S.W. (2000):
Characterization of novel rad6/ubc2 ubiquitin-conjugating enzyme mutants in yeast.
Curr. Genet. 37, 221-233.
- 23) Gehrke, P.P., Ziegenhagen, R.G. & Jennissen, H.P. (1987):
Isolation of ubiquitin conjugating activity from cardiac muscle by affinity chromatography on ubiquitin-agarose.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 744
- 24) Gehrke, P.P. & Jennissen, H.P. (1987):
ATP-dependent proteolysis and the role of ubiquitin in rabbit cardiac muscle.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 744
- 25) Glotzer, M., Murray, A.W. & Kirschner, M.W. (1991):
Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.
Nature 349, 132-138
- 26) Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. & Peters, J.M. (2004):
The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex.
Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 8973-8978
- 27) Goldberg, J., Nairn, C. & Kuriyan, J. (1996):
Structural Basics for the Autoinhibition of Calcium/ Calmodulin-dependent Protein Kinase I.
Cell 84, 875-887.
- 28) Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Boyse, E.A., Schlesinger, D.H. & Niall, H.D. (1975):
Isolation of a polypeptid that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 11-15
- 29) Gregori, L., Marriot, D., West, C.M. & Chau, V. (1985):
Specific recognition of calmodulin from *Dictyostelium discoideum* by the ATP ubiquitin dependent degradative pathway.
J. Biol. Chem. 257, 2543-2548
- 30) Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997):
SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.
Electrophoresis 18, 2714-2723.
- 31) Gunsteren, van W.F. (1996):
Biomolecular simulation: the GROMOS user and manual guide.
Zürich: Vdf Hochschulverlag ETHZ

- 32) Hepler, P.K. (1992):
Calcium and Mitosis.
Int. Rev. Cytol. 138, 239-268
- 33) Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. & Rose, I.A. (1980):
Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with
multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis.
Biochem. 77, 1783-1786
- 34) Hershko, A., Ciechanover, A. & Rose, I.A. (1981):
Identification of the active amino acid residue of the polypeptid of the ATP-
dependent protein breakdown.
J. Biol. Chem. 256, 1525-1528
- 35) Hershko, A., Eytan, E., Ciechanover, A. & Haas, A.L. (1982):
Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in
intact cells.
J. Biol. Chem. 257, 13964-13970
- 36) Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. (1983):
Components of ubiquitin-protein-ligase system.
J. Biol. Chem. 258, 8206-8214
- 37) Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoth, D. & Heller, H. (1984):
ATP-depdnent degradation of ubiquitin-protein conjugates.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1619-1623
- 38) Hershko, A., Heller, H., Eytan, E. & Reiss, Y. (1986):
The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system.
J. Biol. Chem. 261, 11992-11999
- 39) Hochstrasser, M. (2002):
Molecular biology. New proteases in a ubiquitin stew.
Science 298, 549-552.
- 40) Hubbard, M., Bradley, M., Sullivan, P., Shepard, M. & Forster, I. (1982):
Evidence for the occurence of calmodulin in the yeasts *Candida albicans* and
Saccharomyces cerevisiae .
FEBS Letters 137, 85-88
- 41) Hutchins, J.R., Dikovskaya, D. & Clarke, P.R. (2003):
Regulation of Cdc2/Cyclin B Activation in Xenopus Egg Extracts via
Inhibitory Phosphorylation of Cdc25C Phosphatase by Ca²⁺/Calmodium-
dependent Kinase II.
Mol. Biol. Cell. 14, 4003-4014
- 42) Iwaya, K., Ogawa, H., Mukai, Y., Iwamatsu, A. & Mukai, K. (2003):
Ubiquitin-immunoreactive degradation products of cytokeratin 8/18 correlate
with aggressive breast cancer.
Cancer Sci. 94, 864-870.

- 43) Jennissen, H.P. & Laub, M. (1988):
Ubiquitin-calmodulin conjugation activity from cardiac muscle.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 1325-1330
- 44) Jennissen, H.P., Botzet, G., Majetschak, M., Ziegenhagen, R. & Demiroglou, A. (1992):
Ca²⁺-dependent ubiquitination of calmodulin in yeast.
FEBS Lett. 296, 51-56
- 45) Jennissen, H.P. & Botzet, G. (1993):
The binding of phosphorylase kinase to immobilized calmodulin.
J. Mol. Recog. 6, 117-130
- 46) Jennissen, H.P. (1995):
Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation.
Eur. J. Biochem. 231, 1-30
- 47) Jensen, L.E., & Whitehead, A.S. (2003):
Ubiquitin activated tumor necrosis factor receptor associated factor-6 (TRAF6) is recycled via deubiquitination.
FEBS Lett. 553, 190-194
- 48) Kim, M.J., Jo, D.G., Hong, G.S., Kim, B.J., Lai, M., Cho, D.H., Kim, K.W., Bandyopadhyay, A., Hong, Y.M., Kim, D.H., Cho, C., Liu, J.O., Snyder, S.H. & Jung, Y.K. (2002):
Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99, 9870-9875
- 49) Klee, C.B. & Vanaman, T.C. (1982):
Calmodulin.
Adv. Protein Chem. 35, 213-321
- 50) Kohse, K.P. & Heilmeyer Jr, M.G. (1981):
The effect of Mg²⁺ on the Ca²⁺-binding properties and Ca²⁺ - induced tyrosine-fluorescence changes of calmodulin isolated from rabbit skeletal muscle.
Eur. J. Biochem. 117, 507-513
- 51) Laemmli, U.K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.
- 52) Laub, M. & Jennissen, H.P. (1991):
Ubiquitination of myosin light chains.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 372, 704
- 53) Laub, M., & Jennissen, H.P. (1997):
Synthesis and decay of calmodulin-ubiquitin conjugates in cell-free extracts of various rabbit tissues.
Biochim. Biophys. Acta. 1357, 173-191

- 54) Laub, M., Steppuhn, J.A., Blüggel, M., Immler, D., Meyer, H.E. & Jennissen H.P. (1998):
Modulation of calmodulin function by ubiquitin-calmodulin ligase and identification of the responsible ubiquitylation site in vertebrate calmodulin. *Eur. J. Biochem.* 255, 422-431.
- 55) Lehr Von der, N., Johansson, S. & Larsson, C.(2003):
Implication of the ubiquitin/proteasome system in myc-regulated transcription. *Cell Cycle* 2, 403-407.
- 56) Liu, L., Maillet, D.S., Frappier, J.R., d'Ailly, K., Walden, D.B. & Atkinson, B.G. (1996):
Characterization, chromosomal mapping, and expression of different ubiquitin fusion protein genes in tissues from control and heat-shocked maize seedlings. *Biochem. Cell. Biol.* 74, 9-19.
- 57) Liu, X-Ch. & Scouten, W.H. (1996):
Studies on Oriented and Reversible Immobilization of Glycoprotein using Novel Boronate Affinity Gel. *J. Mol. Recog.* 9, 462-467
- 58) Lowe, J., Blanchard, A., Morrel, K., Lennox, G., Reynolds, L., Billett, M., Landon, M. & Mayer, R.J. (1988):
Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmatic bodies in muscle, and mollary bodies in alcohol liver disease. *J. Pathol.* 155, 9-15
- 59) Lowry, H.O., Roseborough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 262-275
- 60) Luk, YY., Tingey, M.L., Dickson, K.A., Raines, R.T. & Abbott N.L. (2004):
Imaging the binding ability of proteins immobilized on surfaces with different orientations by using liquid crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9024-9032
- 61) Lukas, T.J., Iverson, D.B., Schleicher, M. & Watterson, D.M. (1984):
Structural characterization of a higher plant calmodulin. *Plant. Physiol.* 75, 788-795
- 62) Madura, K., Prakash, S. & Prakash, L. (1990):
Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD6 that encodes a ubiquitin conjugating enzyme, increases in response to DNA damage and in meiosis but remains constant during the mitotic cell cycle. *Nucleic. Acids Res.* 18, 771-778
- 63) Majetschak, M., Laub, M., Meyer, H. E & Jennissen, H.P (1998a):
The ubiquitin-calmodulin synthetase system from rabbit reticulocytes:

- Isolation of the ubiquitin-binding first component, a ubiquitin-activating enzyme.
Eur. J. Biochem. 255, 482-491
- 64) Majetschak, M., Laub, M., Klocke, C., Stepphuhn, J.A. & Jennissen, H.P. (1998b):
The ubiquityl-calmodulin synthetase system from rabbit reticulocytes:
Isolation of the ubiquitin-binding second component and enzymatic properties.
Eur. J. Biochem. 255, 492-500
 - 65) Manalan, A.S. & Klee, C.B. (1984):
Calmodulin
In: Greengard, P. & Robins, G.A. (Eds): Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research 18, S. 227-279. New York: Raven Press
 - 66) Mauguen, Y., Hartley, R.W., Dodson, E.J. & Dodson, G.G. (1982):
Molecular structure of a new family of ribonucleases.
Nature 297, 162
 - 67) Mayer, R.J. & Doherty, F.J. (1991):
Ubiquitin.
Essays Biochem. 26, 37-48
 - 68) Mazo del, M.L., Torrejon, P., Careche, M. & Tejada, M. (1999):
Characteristics of the salt-soluble fraction of hake (*Merluccius merluccius*)
fillets stored at -20 and -30 degrees C.
J. Agr. Food Chem. 47, 1372-1377
 - 69) Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L. & Rock, K.L. (1993):
A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class-I-
restricted antigen presentation.
Nature 363, 552-554
 - 70) Mori, S., Heldin, C.-H. & Claesson-Welsh, L. (1993):
Ligand induced ubiquitination of the platelet-derived growth factor β -receptor
plays a negative regulatory role in its mitogenic signaling.
J. Biol. Chem. 268, 557-583
 - 71) Murray, G., Marshall, M.J., Trumble, W. & Magnuson, B.A. (2001):
Calmodulin-binding protein detection using a non-radiolabeled calmodulin
fusion protein.
Biotechniques 5, 1036-1042.
 - 72) Özkaynak, E., Finley, D. & Varshavsky, A. (1984):
The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin
precursor protein.
Nature 312, 663-666
 - 73) Rati, V.L., Aravind, R.O., Hayes, M.D., John, R.Y.III., Eugene, V.K. &
Raymond, J. D. (2002):

Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome.
Science 298, 611

- 74) Rodes, G. (2000):
Crystallography made crystal clear. 2. Ed.
Sydney: Academic Press Inc.
- 75) Riede, U.N. & Schaefer, H.E. (2001):
In: Riede, Schäfer (Eds): Allgemeine und spezielle Pathologie
5. Auflage; S.1055-1056. München, Frankfurt: Georg-Thieme Verlag
- 76) Sairam, M.R. & Porath, J. (1976):
Isolation of antibodies to protein hormones by bioaffinity chromatography on divinylsulfonil sepharose.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 190-196
- 77) Sayle, R. & Milner-White, E.J. (1995):
RasMol: Biomolecular graphics for all.
Trends Biochem. Sci. 20, 374.
- 78) Sippl, J. (1990):
Calculation of Conformational Ensembles from Potential of Mean Forces.
J. Mol. Biol. 213, 859-883
- 79) Stryer, L. (2003):
In: Stryer (Editor), Biochemie.
Fünfte neubearb. Aufl.; S. 828. Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft-Verlagsgesellschaft
- 80) Sundberg, L. & Porath, J. (1974):
Preparation of adsorbents for Biospecific affinity chromatography.
J. Chromato. 90, 87-98
- 81) Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. (1990):
Mutation of the cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD 6 protein abolishes its ubiquitin-conjugation activity and its various biological functions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2695-2699
- 82) Thess, A., Hutschenreiter, S., Hofmann, H., Tampé, R., Baumeister, W. & Guckenberger, R. (2002):
Specific Orientation and Two-dimensional Crystallization of the Proteasome at Metal-chelating Lipid Interface.
J. Biol. Chem. 277, 36321-3628
- 83) Thompson, L.K. (2002):
Solid-state NMR studies of the structure and mechanisms of proteins.
Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 661-669
- 84) Thomson, N.H., Smith, B.L., Almquist, N., Schmitt, L., Kashlev, M., Kool, E.T. & Hansma, P.K. (1999):

- Oriented, active *Escherichia coli* RNA polymerase: an atomic force microscope study.
Biophys. J. 76, 1024-1033.
- 85) Turkova, J., Fusek, M., Maksimov, J. & Alakhov, Y.B. (1986):
Reversible and irreversible immobilization of Carboxypeptidase Y using
biospecific adsorption.
J. Chromatogr. 376, 315-321
 - 86) Turkova, J., Kucerova, Z. & Benes, M.J. (1996):
Detection of Pathological Changes of Proteins by Peptide Mapping after
Protein Digestion by Use of Oriented Immobilized Proteinases.
J. Mol. Recognit. Vol. 9, 360-363
 - 87) Turkova, J.(1999):
Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing
protein interactions and function.
Chromatogr. Biomed. Sci. Appl. 722, 11-31
 - 88) Vankova, R., Gaudinova, A., Sussenbekova, H., Dobrev, P., Strnad, M., Holik,
J. & Lenfeld, J. (1998):
Comparison of oriented and random antibody immobilization in
immunoaffinity chromatography of cytokinins.
J. Chromatogr. A. 811, 77-84.
 - 89) Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, JR 3rd, Koonin,
E.V. & Deshaies, R.J. (2002):
Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S
proteasome.
Science 298, 611-615.
 - 90) Wang, Z. & Jin, G. (2003):
Feasibility of protein A for the oriented immobilization of immunoglobulin on
silicon surface for a biosensor with imaging ellipsometry.
J. Biochem. Biophys. Methods. 57, 203-211.
 - 91) Wilchek, M. & Bayer, E.A. (1990):
Avidin-Biotin Technology.
Meth. Enzymol. 184, 746
 - 92) Wilchek, M. & Miron, T. (2002):
Oriented versus random protein immobilization.
J. Biochem. Biophys. Methods 55, 67-70
 - 93) Wilkinson, K.D., Urban, M.K. & Haas, A.L. (1980):
Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes.
J. Biol. Chem. 255, 7529-7532
 - 94) Yamakawa, H., Katou, S., Seo, S., Mitsuhara, I., Kamada, H. & Ohashi. Y.
(2004):
Plant MAPK phosphatase interacts with calmodulin.

- J. Biol. Chem. 279, 928-936
- 95) Yan, Y. L., Matthew, L., Tingey, K.A., Dickson, R.T., Raines, C. & Abbott, N.L. (2004):
Imaging the Binding Ability of Proteins Immobilized on Surfaces with Different Orientations by Using Liquid Crystals.
J. Am. Chem. Soc. 126, 9024 -9032
 - 96) Yao, T. & Cohen, R.E. (2002):
A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome.
Nature 419, 403-407.
 - 97) Ziegenhagen, R., Gehrke, P. & Jennissen, H.P. (1988):
Covalent conjugation of mammalian calmodulin with ubiquitin.
FEBS Letters 237, 103-107
 - 98) Ziegenhagen, R. & Jennissen, H.P. (1988):
Multiple ubiquitination of vertebrate calmodulin by reticulocyte lysate and inhibition of calmodulin conjugation by phosphorylase kinase.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 1317-1324
 - 99) Ziegenhagen, R. & Jennissen, H.P. (1990):
Plant and fungus calmodulins are polyubiquitinated at a single site in a Ca^{2+} -dependent manner.
FEBS Letters 273, 253-256
 - 100) Zielinski, R.E. (1998):
Calmodulin and Calmodulin-binding proteins in plants.
Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 49, 697-725.

Abkürzungen

A	Alanin
3-D	dreidimensional
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
APFII	Eluat der DEAE-Präparation
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BH-Calmodulin	nach der Methode von Bolton und Hunter modifiziertes Calmodulin (s. 2.2.3 und 2.2.4)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cystein
Ca ²⁺ - Quotient	Quotient der Enzymaktivität +Ca ²⁺ / -Ca ²⁺
CaM	Calmodulin
CaM-Seph-E	Eluat der GST-Calmodulin-Sepharose-Präparation
CaM-Seph-E Präparation	Affinitätschromatographie auf GST-CaM-Sepharose
CBP	Calmodulin bindendes Protein
Chloramin T (CT)	N-Chlor-4-Toluolsulfonamid Natriumsalztrihydrat
Ci	Curie, Maßeinheit für radioaktiven Zerfall, entspricht 37 Mio. Becquerel
cpm	gezählte radioaktive Impulse pro Minute
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DTE	Dithiothreitol
DVS	Divinylsulfon
DVS-CaM-Seph	nicht orientiert immobilisiertes Calmodulin, GST-Calmodulin Sepharose
E1	Ubiquitin-Aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-Träger bzw. Konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein-Ligase Komponente 3
E.C.	Enzymklassifikation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz
EGTA	Ethylenglykolbis(2-aminoethylether)-N,N`-tetraessigsäure
FP-	Fluphenazin-

Gl.	Gleichung
Glu-Seph	Glutathion-Sepharose
Glu-SH	Glutathion
GP	Natrium-Glycerophosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GST-CaM-Seph	orientiert immobilisiertes Calmodulin
His	Histidin
I.D.	innerer Durchmesser
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kat	katal, mol/s
K_m	Michaelis-Konstante
lg	dekadischer Logarithmus
Lys	Lysin
m	Molekulare Masse in Dalton
MP	fettarmes Milchprotein
MW	Mittelwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PbK	Phosphorylase Kinase
PBS	Phosphat buffered saline, Phosphatpuffer, Zusammensetzung s. 2.2.8
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP_i	Pyrophosphat
r	Korrelationskoeffizient
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Serin
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumaurylsulfat
spez. Aktivität	spezifische Aktivität, kat/kg Protein
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ub	Ubiquitin
Ubi-Seph	Ubiquitin-Sepharose
uCaM	Ubiquitin-Calmodulin-Konjugat

uCaM-Syn	Ubiquityl-Calmodulin-Ligase (Synthetase) E.C. 6.3.2.21
uCaM Syn-F1	Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase Komponente 1
uCaM Syn-F2	Ubiquityl-Calmodulin-Synthetase Komponente 2
U-Seph-D	Ubiquitin-Sepharose-Durchlauf bei Auftrag von APFII
V_0	Ausschlußvolumen
V_e	Elutionsvolumen
V_{total}	Totalvolumen
v/v	Volumenverhältnis (ml/ml)
w/v	Gewichtsverhältnis (g/ml)

7.**Danksagung**

Mein erster und vornehmlicher Dank gilt meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. H.P. Jennissen. Ihm danke ich herzlichst für die Betreuung bei der Arbeit. Sein ständiges Interesse, seine fortwährende Unterstützung und viele fruchtbare Diskussionen waren mir immer wieder Ansporn bei der Arbeit.

Herrn Dr. Laub möchte ich danken für zahlreiche Anregungen und für die Einführung in zahlreiche Themengebiete, weiterhin danke ich ihm für die Unterstützung bei einigen radiaktiven Markierungen.

Herrn Dr. Stepphuhn bin ich zu Dank verpflichtet für die Überlassung der Bakterienstämme.

Herrn Dr. Zumbrink danke ich herzlichst für die Präparation der Glutathion-Agarose.

Frau Dudziak und Frau Caron bin ich zu Dank verpflichtet für die Unterstützung während zahlreicher Versuche.

Allen Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung in vielfältigen Gegebenheiten.

8. Lebenslauf

Name: Cyrus Khandanpour, wohnhaft in Essen

Geburtsdatum und -ort: 5.04.1977, Teheran/ Iran

Schulbildung: 1983-1986
 Grundschule 12 in Teheran/ Iran
 1986-1987
 Aplerbecker Grundschule, Dortmund
 1987-1988
 Gymnasium an der Schweizer Allee, Dortmund
 1988-1996
 Helene-Lange Gymnasium, Dortmund

Studium: 1996-2003
 Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
 1997-1998
 Austausch mit University of Leicester

Dissertation: 1999-2002
 Durchführung des experimentellen Teils
 bei Prof. Dr. H.P. Jennissen am Institut für Physiologische
 Chemie, Abteilung für biochemische Endokrinologie des
 Universitätsklinikums Essen
 Tätigkeit als studentische Hilfskraft während des
 experimentellen Teils der Dissertation

Berufstätigkeit: 7/2003-9/2004
 Arzt im Praktikum
 Im Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums
 Essen, Abteilung für Hämatologie, Prof. U.C. Dührsen
 10/2004-12/2004
 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
 Im Zentrum für Innere Medizin des
 Universitätsklinikums Essen, Abteilung für Hämatologie
 Prof. U.C. Dührsen
 01/2005-aktuell
 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
 Institut für Zellbiologie
 AG. Prof Möröy